



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS DE DOCTORA EN AGRONOMÍA**

***Helianthus annuus* L. NATURALIZADOS EN ARGENTINA CON  
ATRIBUTOS DE INTERÉS PARA LA MEJORA DEL GIRASOL**

**IVANA FERNÁNDEZ MORONI**

**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2016**



## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre el mes de junio de 2010 y el mes de agosto de 2016, bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Cantamutto.

.....



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General De Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ...../...../....., mereciendo la calificación de .....(.....).



Dedicado a mi marido Santiago, mi hija Emma y mis padres, Norma y Hector.



## **AGRADECIMIENTOS**

Mis agradecimientos a quienes han permitido que esta tesis se lleve a cabo:

Al Dr. Cantamutto, director de mi tesis, quien confió en mí para que continuara con la selección del germoplasma que él había comenzado. Por el esfuerzo y tiempo dedicado en mi formación profesional, así también como por su meticulosa revisión y corrección de la tesis.

Al M.Sc Daniel Álvarez, mejorador de girasol de la Estación Experimental Agropecuaria Manfredi, quién proveyó las semillas de las líneas endocriadas de girasol que he utilizado y atendió amablemente a todas mis consultas.

Al Dr. Sergio Lenardon, director del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP)-INTA, y al Dr. Fabián Giolitti, investigador del Instituto de Patología Vegetal-CIAP-INTA, por su colaboración en la selección del material vegetal resistente a SuCMoV que nosotros enviamos.

A los técnicos del laboratorio del INTA Manfredi, en especial a M.J. Martínez, y al Dr. Leonardo Velasco Varo, investigador del Instituto de Agricultura Sostenible, España, por permitirme realizar el análisis del perfil de ácidos grasos en granos de girasol.

Al Dr. Antonio Garayalde, Dr. Alejandro Presotto, Dr. Claudio Pandolfo y al Dr. Mauricio Casquero quienes me han prestado material propio y han dedicado preciosas horas de su tiempo para ayudarme en la realización de mis ensayos, análisis estadísticos y evacuación de mis dudas en general.

A la Dra. Mónica Poverene, Dra. Ivone Lindstrom, Dr. Luis Hernández, Dr. Carlos Lobartini y al Dr. Gustavo Orioli por haberme prestado equipos de laboratorio que utilicé durante la realización de mis ensayos, y atender amablemente todas mis consultas.

Al Tec. Luciano Rodriguez del Laboratorio de Nutrición Mineral del Dto. de Agronomía de la UNS por haberme ayudado con las tareas realizadas en el laboratorio.

A la cátedra de pasturas del Dto. de Agronomía de la UNS por prestarme la cámara de crecimiento para realizar los ensayos.

A la Lic. Sandra Baioni, Lic. María Fioretti y al Dr. Roberto Bredan por prestarme un lugar dentro del espacio de la Cátedra de Fisiología Vegetal para escribir la tesis, conservar el material vegetal derivado de los ensayos y su buena predisposición ante mis consultas.

A mi esposo Santiago y a mi hija Emma por estar incondicionalmente a mi lado durante todos estos años.

A mi familia que me permitió estudiar.

A mis compañeros de trabajo, Mariela, Sandra, Pelusa, Alejandro, Claudio, Mauricio, Soledad, Ana, Agustina por hacer más amenas las jornadas laborales y por sus buenos consejos.

Al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur por haberme facilitado las instalaciones utilizadas para llevar a cabo los ensayos.

A la Universidad Nacional del Sur, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber otorgado las becas de posgrado que posibilitaron la realización de esta tesis.

## RESUMEN

El resultado económico del girasol, *Helianthus annuus* L., depende tanto del rendimiento como de la calidad de su aceite. En Argentina, el rendimiento medio es bajo debido a limitantes productivas bióticas y abióticas. El déficit hídrico es la principal causa de disminución del rendimiento. La temperatura subóptima en siembra temprana bajo labranza cero implica una emergencia lenta, que aumenta el riesgo de pérdida de plantas. La raza común del *Virus del moteado clorótico del girasol* (SuCMoV-C) causa la virosis más difundida en el país, cuya infección puede disminuir significativamente el rendimiento. El perfil ácido del aceite determina su aptitud para cada destino final. Las poblaciones ruderales *H. annuus* ssp. *annuus* (RUD) de nuestro país presentan alta variabilidad fenotípica y genotípica, y podrían utilizarse para la mejora genética del girasol.

Los objetivos de esta tesis fueron: 1) conformar un conjunto de stocks genéticos (SG) de girasol con mejor performance bajo temperatura subóptima en la etapa de implantación del girasol, a partir de RUD tolerantes; 2) explorar la performance de las RUD en condiciones de déficit hídrico durante iniciación reproductiva-R9; 3) conformar un stock genético con alta frecuencia de individuos con resistencia a SuCMoV-C, a partir de RUD resistentes; 3) evaluar el valor como recurso genético para mejorar la calidad de aceite de girasol de una RUD con un perfil ácido peculiar; 5) caracterizar fenotípicamente los SG generados.

Los SG 8TF y 10TF más promisorios, fueron generados mediante selección por mayor crecimiento y desarrollo a temperatura subóptima durante la etapa de implantación del cultivo. 10TF tuvo mayor germinación acumulada a 5°C, y mayor tasa de desarrollo y crecimiento de planta joven a temperatura subóptima; 8TF tuvo menor tiempo medio de germinación a 10°C; ambos SG presentaron menor temperatura basal de germinación que los híbridos.

La RUD RIV tuvo mayor resistencia a déficit hídrico durante la etapa reproductiva. Se destacó por la capacidad de controlar el estado hídrico y moderada reducción de la estructura reproductiva bajo estrés. Un SG, RIV-FS, se generó aplicando fertilización selectiva *in vivo* mediada por estrés osmótico sobre RIV.

Se conformaron cuatro SG completamente resistentes a SuCMoV-C mediante selección por resistencia a SuCMoV-C de plantas con alto grado de autofecundación.

Los cruzamientos con DIA tuvieron mayor variabilidad en la composición acidica. En los SG BC1F2 y BC2F1 se identificaron individuos con perfiles acídicos de interés; con alta concentración de ácido palmítico (87,6 g/kg), esteárico (73,4 g/kg), oleico (533,8 g/kg) y linoleico (784 g/kg).

Los SG 8TF, 10TF y resistentes a SuCMoV-C tuvieron una altura de planta menor a dos metros, capítulo principal de mayor tamaño, ramificaciones en el vástago, la biomasa de mil cipselas fue mayor a 12 g, la duración del período siembra-R9 fue menor a 160 días y más de 50 cipselas/capítulo fueron generadas mediante autofecundación. A diferencia, RIV-FS presentó mayor altura, menor biomasa seminal y mayor longitud del ciclo ontogénico.

Los SG descriptos se depositaron en el Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi, bajo denominación CGGI1351, CGGI1352, CGGI1353, CGGI1354, CGGI1355, CGGI1356, CGGI1357, CGGI1358 y CGGI13519.

**ABSTRACT**

The economic outcome of sunflower, *Helianthus annuus* L., depends on the yield and on the quality of its oil. In Argentina, the average yield is low because crop production faces biotic and abiotic constraints. Water deficit is the main cause of decreased yield. Sub-optimal temperature at the early no-tillage seedlings stage involves slow emergence, which increases the risk of plant loss. The common race of *Sunflower chlorotic mottle virus* (SuCMoV-C) causes the most widespread viral disease in the country and this infection can significantly decrease performance. The fatty acid profile of sunflower oil determines its aptitude for each application. In Argentina, the *H. annuus* ssp. *annuus* ruderal populations (RUD) present high phenotypic and genotypic variability, and could be used for the genetic improvement of sunflower.

The aims of this thesis were to: 1) generate a set of genetic stocks (SG) of sunflower with better performance under suboptimal temperature at sunflower seedling establishment, from tolerant RUD; 2) explore the performance of RUD under water deficit conditions from capitulum initiation to R9; 3) develop a genetic stock with high frequency of SuCMoV-C resistant individuals, from resistant RUD; 4) appraise the value of a RUD with a peculiar acid profile as a genetic resource for improving the quality of sunflower oil; 5) characterize the SG generated phenotypically.

The SG 8TF and 10TF strains, which were the most promising, were generated by means of selection for further growth and development under sub-optimal temperature during crop establishment. 10TF showed higher germination at 5°C and a higher rate of growth and development under suboptimal temperature; 8TF showed lower mean germination time at 10°C; both SG had a lower basal temperature of germination than the hybrids.

The RUD RIV showed major resistance to water deficit during the reproductive stage. Its capacity to control the water status was notable and it only showed a moderate reduction in the reproductive structure under stress. An SG, RIV-FS was generated by applying *in vivo* pollen selection by osmotic stress on RIV.

Four SG resistant to SuCMoV-C were generated. They were formed by means of selection of SuCMoV-C resistant plants with a high degree of self-fertilization.

Crossbreeding with DIA resulted in greater variability in fatty acid composition. In the SG BC1F2 and BC2F1, individuals with an acid profile of interest were identified; with a high concentration of palmitic (87.6 g/kg), stearic (73.4 g/kg), oleic (533.8 g/ g) and linoleic (784 g/kg) acid.

The SG 8TF, 10TF resistant to SuCMoV-C was less than two meters in height, the main capitulum was larger, it had branches on the stem, the thousand cypsela weight was higher than 12 g, the duration of the phase from sowing-R9 was lower than 160 days, and more than 50 cypsela/capítulum were generated by self fertilization. In contrast, RIV-FS was taller, with less seminal biomass and greater length of ontogenetic cycle.

The SG described were deposited in the Active Germplasm Bank of INTA Manfredi, under the designations CGGI1351, CGGI1352, CGGI1353, CGGI1354, CGGI1355, CGGI1356, CGGI1357, CGGI1358 and CGGI13519.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del director



## ÍNDICE

<b>PREFACIO.....</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE DE IMÁGINES.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XXV</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1: CONFORMACIÓN DE UN STOCK GENÉTICO CON TOLERANCIA A TEMPERATURA SUBÓPTIMA DURANTE EL PERÍODO DE IMPLANTACIÓN DEL GIRASOL.....</b>	<b>17</b>
INTRODUCCIÓN.....	19
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	62
<b>CAPÍTULO 2: RESPUESTA ANTE EL DÉFICIT HÍDRICO DE POBLACIONES RUDERALES ARGENTINAS DE <i>Helianthus annuus</i>.....</b>	<b>63</b>
INTRODUCCIÓN.....	65
HIPÓTESIS.....	71
OBJETIVOS.....	72
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
RESULTADOS.....	85
DISCUSIÓN.....	101
CONCLUSIONES.....	109

<b>CAPÍTULO 3: CONFORMACIÓN DE UN STOCK GENÉTICO DE GIRASOL CON RESISTENCIA AL VIRUS DEL MOTEADO CLORÓTICO DE GIRASOL.....</b>	<b>109</b>
INTRODUCCIÓN.....	111
HIPÓTESIS.....	114
OBJETIVO.....	114
MATERIALES Y MÉTODOS.....	116
RESULTADOS.....	121
DISCUSIÓN.....	125
CONCLUSIONES.....	130
<b>CAPÍTULO 4: DIAMANTE, POBLACIÓN RUDERAL <i>Helianthus annuus</i>, RECURSO GENÉTICO POTENCIAL PARA LA MEJORA DE LA CALIDAD DEL ACEITE DE GIRASOL.....</b>	<b>129</b>
INTRODUCCIÓN.....	131
HIPÓTESIS.....	134
OBJETIVO.....	134
MATERIALES Y MÉTODOS.....	135
RESULTADOS.....	139
DISCUSIÓN.....	147
CONCLUSIONES.....	156
<b>CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS STOCKS GENÉTICOS DEPOSITADOS EN EL BANCO ACTIVO DE GERMOPLASMA DEL INTA MANFREDI.....</b>	<b>155</b>
INTRODUCCIÓN.....	157
HIPÓTESIS.....	159
OBJETIVO.....	159
MATERIALES Y MÉTODOS.....	160
RESULTADOS.....	164
DISCUSIÓN.....	168
CONCLUSIONES.....	177
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>179</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>187</b>
<b>ANEXO DE IMÁGENES.....</b>	<b>221</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura I:** Ubicación de las poblaciones naturalizadas de *H. annuus* y *H. petiolaris* en relación con el área de producción de girasol en territorio argentino. Cada símbolo representa un departamento provincial donde la especie se encuentra presente. Origen: a: Poverene *et al.* 2002; b: MINAGRI 2016.....9
- Figura 1.1:** Genealogía de las poblaciones segregantes seleccionadas por mayor desarrollo a temperatura subóptima durante germinación-V2.....33
- Figura 1.2:** Dinámica de la germinación de poblaciones seleccionadas (6TF, 8TF, 9TF, 10TF y 13TF), ruderales (RUD) y dos híbridos de girasol (HIB), expuestos durante quince días a 5, 10, 15, 20 y 25 °C.....38
- Figura 1.3:** Efecto de la temperatura sobre la tasa diaria de germinación (TG) de las poblaciones seleccionadas (PSel), ruderales (RUD) y los híbridos de girasol (HIB)....40
- Figura 1.4:** Regresión lineal entre la tasa diaria (TG) y la temperatura de germinación (T), y  $T_b$  de a) poblaciones seleccionadas (PSel), b) poblaciones ruderales (RUD) y c) los híbridos de girasol (HIB).....43
- Figura 1.5:** Análisis de componentes principales de poblaciones segregantes (6TF, 8TF, 9TF, 10TF y 13TF), poblaciones ruderales (AAL, BAR, DIA, LMA y RIV) y dos híbridos de girasol (A10xRH432 y HA89xRH274) evaluadas durante la germinación y el desarrollo de planta joven a temperaturas subóptimas. ....54
- Figura 2.1:** Esquema del procedimiento utilizado en la fecundación selectiva *in vivo* en el primer, segundo y tercer ciclo. El procedimiento descrito se repitió hasta que todas las flores tubulares del capítulo estuvieran abiertas.....74
- Figura 2.2:** Vista de un cuarto de capítulo seccionado transversalmente bajo la lupa. Se señaló una de las flores tubulares contabilizadas.....76
- Figura 2.3:** Evapotranspiración potencial y precipitaciones (mm de agua) ocurridas durante la etapa reproductiva (R1-R9) del material vegetal en los meses de enero, febrero y marzo de 2009 y 2011.....80

- Figura 2.4:** Deshidratación acumulada relativa al contenido de agua inicial (%) de discos foliares expuestos al aire durante 120 minutos de BAR-FS, LMA-FS, RIV-FS, B59 y B71.....88
- Figura 3.1:** Genealogía del material segregante S10 con resistencia a SuCMoV-C. BAR: RUD de Colonia Barón. CAR: RUD de Carhué. R: planta resistente a la inoculación con SuCMoV-C.....117
- Figura 3.2:** Generación del stock genético resistente a la cepa común del *Virus del moteado clorótico de girasol*, SuCMoV-C, a partir del cruzamiento de cuatro plantas S10 resistentes a SuCMoV-C con la línea endocriada, A09 y su mantenedora B09...120
- Figura 3.3:** Plantas inoculadas con SuCMoV-C con síntomas visibles de la infección. Planta susceptible (a), tolerante (b) y resistente con punteado escaso (c).....122
- Figura 4.1:** Generación de granos F2 y F3 a partir del cruzamiento entre A10, DIA y RIV. ♀: parentales u órganos femeninos. ♂: parentales u órganos masculinos. ⊗: autofecundación.....137
- Figura 4.2:** Generación de granos F3, BC2F1, BC1F2 a partir del cruzamiento entre DIA o BAR y A09 o B09. ♀: parentales femeninos. ♂: parentales masculinos. ⊗: autofecundación.....139
- Figura 4.3:** Contenido (g/kg) de ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) en el aceite de granos de DIA, F2(A10xDIA), F3(A10xDIA), RIV, F2(A10xRIV), F3(A10xRIV) y B10.....144
- Figura 4.4:** Histograma del contenido de (a) ácido palmítico (C16:0), (b) ácido esteárico (C18:0) y (c) del contenido de ácido palmítico más esteárico (C16:0+C18:0) en el aceite de granos individuales de la F3, el BC1F2 y el BC2F1 generadas a partir del cruzamiento de A09 o B09 con DIA.....147
- Figura 4.5:** Contenido de ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) en granos individuales de la F3, el BC1F2 y el BC2F1 derivadas del cruzamiento entre A09 o B09 y DIA. La línea gris perpendicular a la abscisa representa el contenido medio de ácido palmítico del girasol cultivado, mientras que el contenido medio de ácido esteárico (Bervillé 2010) está representado por una línea perpendicular a la ordenada.....148

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I:</b> Acrónimo, localización geográfica, región ecológica y tamaño de las poblaciones de <i>Helianthus annuus</i> utilizadas en el presente trabajo.....	10
<b>Tabla II:</b> Descripción del suelo y el clima del sitio geográfico de procedencia de las cinco poblaciones ruderales de <i>Helianthus annuus</i> de Argentina utilizadas en el presente trabajo. D.: diciembre. E.: enero. F.: febrero.....	14
<b>Tabla 1.1:</b> Caracteres fenotípicos y reproductivos del material vegetal evaluado. Tipo de ramificación: Vástago sin ramificación (Sn), con ramificación basal (B), con ramificación apical (A), con ramificación total (TT). sib: fecundación entre hermanos. @: autofecundación.....	32
<b>Tabla 1.2:</b> Escala utilizada para la estimación del crecimiento y desarrollo.....	35
<b>Tabla 1.3:</b> Viabilidad y dormición (media, máximo y mínimo) de semillas de poblaciones seleccionadas (PSel), ruderales (RUD) y dos híbridos de girasol (HIB)...	36
<b>Tabla 1.4:</b> Análisis de la varianza de la germinación total acumulada a 5, 10, 15, 20 y 25°C, de poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol.....	39
<b>Tabla 1.5:</b> Efecto de la temperatura constante sobre la germinación acumulada (media $\pm$ error estándar) de las poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol.....	39
<b>Tabla 1.6:</b> Parámetros de la curva logística de la dinámica de la germinación de poblaciones segregantes (PSel), ruderales (RUD) y los híbridos de girasol (HIB) a 10 y 15°C de temperatura.....	41
<b>Tabla 1.7:</b> Tiempo medio de germinación (TMG) a 10 y 15°C y diferencial ( $\Delta$ ) de poblaciones seleccionadas (PSel), ruderales (RUD) y dos híbridos de girasol (HIB) a 10°C y 15°C de temperatura.....	42
<b>Tabla 1.8:</b> Duración (días) de dos fases de desarrollo de las poblaciones seleccionadas, ruderales e híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo ( $T_o$ ) y subóptimo ( $T_{so}$ ). Período siembra emergencia (DS-E), emergencia-aparición del segundo par de hojas (DE-2H) y el total del período (DS-2H).....	45

- Tabla 1.9:** Desarrollo y crecimiento alcanzado por las poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol quince días luego de la emergencia (DES), quince días después del 50% de emergencia de la población (DES-50E) y al final del ensayo (DESF) bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).....46
- Tabla 1.10:** Biomasa (mg) del vástago (BV), radicular (BR) y relación BV/BR de plantas de girasol de poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).....48
- Tabla 1.11:** Longitud (cm) del vástago (LV) y de la raíz (LR) de poblaciones seleccionadas, ruderales e híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).....49
- Tabla 1.12:** Superficie (SUF), verdor (VF), área específica (AES) y fuga relativa de electrolitos (REL) foliar de poblaciones seleccionadas, ruderales y los híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).....51
- Tabla 1.13:** Crecimiento relativo foliar y del vástago (media  $\pm$  error estandar) de poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).....52
- Tabla 2.1:** Lámina de riego aplicada durante la etapa reproductiva (R1-R9) del material vegetal en las dos condiciones hídricas exploradas, mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico durante 2009 y 2011.....79
- Tabla 2.2:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos (media  $\pm$  error estandar) de poblaciones ruderales de girasol con fertilización selectiva, BAR-FS, LMA-FS y RIV-FS, y las líneas endocriadas, B59 y B71, susceptible y tolerante a estrés hídrico, respectivamente. Régimen hídrico: menor abastecimiento hídrico (<AH) y mayor abastecimiento hídrico (>AH) durante la iniciación floral-R1. Longitud del vástago (LVP), superficie foliar (SUF) y número de flores por capítulo (FLO).....86
- Tabla 2.3:** Contenido relativo de agua (CRA) en discos foliares de plantas de BAR-FS, LMA-FS, RIV-FS, B59 y B71. Valor inicial de plantas sin déficit hídrico (minuto cero: 0') y luego de 120 minutos de deshidratación (120').....87

**Tabla 2.4:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos vegetativos de planta en poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol. Regímenes hídricos: mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico. ALT: altura de planta. DVP: diámetro del vástago principal. SUF: superficie foliar. LPE: largo del pecíolo.....91

**Tabla 2.5:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos reproductivos de planta en poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol. Regímenes hídricos: mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico. DCAP: diámetro del capítulo. NCA: número de capítulos por planta. SUR: superficie reproductiva.....92

**Tabla 2.6:** Respuesta relativa (Re.; %) de caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos de planta, bajo menor (<AH) abastecimiento hídrico respecto de la condición de mayor abastecimiento (>AH), de poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol. ALT: altura de planta. DVP: diámetro del vástago principal. SUF: superficie foliar. LPE: largo del pecíolo. DCAP: diámetro del capítulo. NCA: número de capítulos por planta. SUR: superficie reproductiva.....93

**Tabla 2.7:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos reproductivos a nivel de capítulo y el rendimiento individual por planta, de poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol. Tratamientos hídricos: mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico. FLO: número de flores por capítulo. BS1000: biomasa de mil cipselas. REND: rendimiento individual por planta.....95

**Tabla 2.8:** Respuesta relativa (Re.; %) de caracteres morfológicos reproductivos a nivel de capítulo y rendimiento individual por planta bajo la condición de menor abastecimiento hídrico (<AH) respecto de la condición de mayor abastecimiento (>AH) durante la etapa reproductiva R1-R9. FLO: número de flores por capítulo. BS1000: biomasa de mil cipselas. REND: rendimiento individual por planta.....96

**Tabla 2.9:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos y fisiológicos foliares, de poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol. Regímenes hídricos: mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico. CRA: contenido relativo de agua. TF: temperatura foliar, TA-TF: delta entre la temperatura del aire y la TF. VF: verdor foliar. AES: área específica foliar.....98

**Tabla 2.10:** Temperatura foliar (TF), delta entre la temperatura del aire y la TF (TA-TF) y contenido relativo de agua (CRA) bajo la condición de menor abastecimiento hídrico y respuesta (Re.; %) del área específica (AES) y el verdor foliar (VF) en la condición de menor abastecimiento hídrico (<AH) respecto de la condición de mayor abastecimiento (>AH) durante la etapa reproductiva R1-R9. Media de los valores obtenidos en 2008-09 y 2010-11.....99

**Tabla 2.11:** Densidad de estomas (DEST) y tricomas (DTRI) (número mm<sup>-2</sup>) y relación DEST/DTRI en la superficie abaxial (Sab) y adaxial (Sad) de hojas (media ± error estandar) de poblaciones ruderales de girasol y el híbrido DK4000.....100

**Tabla 3.1:** Resultados de la inoculación con SuCMoV-C de individuos de la población segregante resistente SuCMoV-C, S10, y de su cruzamiento con las líneas domésticas, A09 y B09, durante el período de desarrollo de los stocks genéticos resistentes a SuCMoV-C: SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3 y SuCMoV-C.4. R: resistente a SuCMoV-C. T: tolerante a SuCMoV-C. S: susceptible a SuCMoV-C.....125

**Tabla 4.1:** Contenido medio de ácido grasos saturados e insaturados en el aceite de granos de DIA, RIV y B10. C16:0= ácido palmítico. C18:0= ácido esteárico. C16:0+C18:0= ácido palmítico más esteárico. C18:1= ácido oleico. C18:2= ácido linoleico. C18:1+C18:2= ácido oleico más linoleico.....143

**Tabla 4.2:** Contenido medio (Med.), máximo (Máx.) y mínimo (Mín.), y coeficiente de variación (CV) del ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) del aceite de granos de la F3, el BC1F2 y el BC2F1 generados a partir de los cruzamientos de la línea A09 o B09 con DIA y BAR.....146

**Tabla 5.1:** Stocks genéticos caracterizados. SG:TF: stocks genéticos tolerantes a temperatura subóptima durante germinación-V2. SG:RIV-FS: stock genético resistente a déficit hídrico. SG:ACEITE: stock genético con rasgos novedosos de calidad de aceite. SG:SuCMoV: stocks genéticos resistentes a SuCMoV-C. ....163

**Tabla 5.2:** Caracteres fenotípicos métricos (media  $\pm$ error estandar) descriptivos de los stocks genéticos tolerantes a temperatura subóptima durante germinación-V2, resistente a déficit hídrico, resistentes a SuCMoV-C y con rasgos de interés de calidad de aceite. ALT: altura de planta. NHO: hojas por planta. NCA: capítulos por planta. SUF: superficie foliar. SAF: semillas autofecundadas por capítulo. B1000: biomasa de mil cipselas. LCI: largo de la cipsela. ACI: ancho de la cipsela. G-R5: días desde la germinación hasta floración. G-R9: días desde la germinación hasta senescencia.....167

**Tabla 5.3:** Caracteres categóricos descriptivos de los stocks genéticos tolerantes a temperaturas subóptimas durante germinación-V2, resistente a deficit hídrico, resistentes a SuCMoV-C y con rasgos de interés de calidad de aceite. RAM: tipo de ramificación del vástago principal. A: ramificación apical. B: ramificación basal. T: ramificación total. CAPR: presencia de capítulo principal. ANT: presencia de antocianas. VERT: sintomatología de verticiliosis. PA: poco afectada. MA: moderadamente afectada. SA: severamente afectada. Au: ausente.  $\otimes$ : autofecundación - : sin datos.....168



## ÍNDICE DE IMÁGENES

- Imagen 1:** Plantas verdes con flores de la población de *H. annuus* ruderal Diamante después de la helada del 23 de abril de 2010, en el jardín común del CE-UNS.....223
- Imagen 2:** Cámara de crecimiento utilizada para realizar la selección de plantas tolerantes a temperaturas subóptimas durante germinación-V2. a) Vista frontal. b) vista del interior. Se observan sobre los estantes bandejas multiceldas rellenas de sustrato.....224
- Imagen 3:** Vista del ensayo a campo (CE-UNS) del experimento 2: Respuesta de poblaciones ruderales argentinas de *H. annuus* ante el déficit hídrico durante R1-R9. Se observa el suelo de las macroparcelas cubierto con nylon. En el medio de las macroparcelas se divisan las parcelas de girasol en estado vegetativo, dispuestas en hilera, y en los bordes sorgo.....225
- Imagen 4:** Plantas de 8TF en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.....226
- Imagen 5:** Plantas de 10TF en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas. a) planta con capítulo único sin antocianas. b) planta con múltiples capítulos sin antocianas c) planta con múltiples capítulos con antocianas.....227
- Imagen 6:** Plantas de SuCMoV-C.1 en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.....228
- Imagen 7:** Plantas de SuCMoV-C.2 en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.....229
- Imagen 8:** Plantas de SuCMoV-C.3 en estado reproductivo, derecha, cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.....230

- Imagen 9:** Plantas de SuCMoV-C.4 en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.....231
- Imagen 10:** Capítulo de una planta de SuCMoV-C.4 con flores liguladas con forma tubular.....232
- Imagen 11:** Plantas del stock genético RIV-FS, con fecundación selectiva *in vivo*, en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.....233

**ABREVIATURAS**

- ⊗: autofecundación  
>AH: mayor abastecimiento hídrico  
<AH: menor abastecimiento hídrico  
%: porcentaje  
°: grados  
°C: grados centígrados  
2H: aparición del segundo par de hojas  
 $\pi$ : número pi  
 $\mu$ S: microsiemens  
AAL: Adolfo Alsina  
AES: área específica foliar  
A: superficie/altura de una hoja/planta  
ALT: altura de planta máxima  
An: ancho foliar  
ANOVA: análisis de la varianza  
a.m: antes del mediodía  
ASAGIR: Asociación Argentina de Girasol  
b: pendiente de la ecuación logística  
B1000: biomasa de mil cipselas  
BAR: Colonia Barón  
BC1: primera retrocruza  
BC2: segunda retrocruza  
BCBA: Bolsa de Cereales de Buenos Aires  
BS: biomasa fresca seminal  
BS1000: biomasa seca de mil cipselas  
BT: biomasa total de planta  
BV: biomasa del vástago  
BR: biomasa del sistema radicular  
C16:0: ácido palmítico  
C18:0: ácido esteárico  
C18:1: ácido oleico  
C18:2: ácido linoleico  
CAR: Carhué  
cc: centímetros cúbicos

CE: conductividad eléctrica

CE-UNS: campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur

CF17: cultivar Contiflor 17

cm: centímetro/s

CM: cuadrados medios

cm<sup>2</sup>: centímetro/s cuadrados

CMS: citoplasma androesteril

CMS-PET1: citoplasma macho esteril fuente PET1 de *H. petiolaris*

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

CRA: contenido relativo de agua

CRF: crecimiento relativo del área de la hoja

CRV: crecimiento relativo del vástago

CV: coeficiente de variación

d: límite superior de la función logística

D: días transcurridos entre mediciones consecutivas

D.: diciembre

DCA: disminución del contenido de agua

DCAP: diámetro del capítulo

DE-2H: días desde E hasta 2H

DES: desarrollo de la planta 15 días después de la E

DES-50E: desarrollo de la planta 15 días después de que el 50% de las plántulas de cada material vegetal alcanzaran la etapa E

DESF: desarrollo de planta a la finalización del ensayo

DEST: densidad de estomas

DG: días transcurridos desde la siembra hasta la germinación

DIA: Diamante

DOR: semillas dormantes

DSA120: disminución relativa del contenido de agua a los 120 minutos.

DS-E: días transcurridos desde la siembra hasta E

DS-2H: días desde la siembra hasta 2H

DTRI: densidad de tricomas

DVP: diámetro del vástago principal

e: días desde la siembra en que se alcanza el 50% de la germinación

E: emergencia

E.: enero

*et al.*: y otros

ETP: evapotranspiración potencial

exp: exponente

f: final

F: coeficiente entre cuadrados medios

F1: híbrido de primera generación

F2: descendientes de F1

F3: descendientes de F2

F4: descendientes de F3

F.: Febrero

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FINUT: Fundación Iberoamericana de Nutrición

FLO: flores formadas por capítulo

FS: fecundación selectiva

g: gramo/s

GA: germinación total acumulada

GT: total semillas germinadas al día 15

h: hora/s

ha: hectarea

HIB: híbrido/s

i: inicial

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

ISTA: International Seed Testing Association

$K_{cb}$ : coeficiente basal del cultivo de girasol

kg: kilogramo/s

m: metro/s

M: molar

MA: plantas moderadamente afectadas por *Verticillium*

Máx.: máximo

ME: planta androesteril

Med.: medio

Mín.: mínimo

mm: milímetro/s

$mm^2$ : milímetro/s cuadrados

MINAGRI: Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación Argentina

ml: mililitro

MPa: Megapascal

MV: material vegetal

n: número de muestras

NCA: número de capítulos

Ncip: número de cipselas

NS: sin producción de semillas

núm.: número/s

Nutt.: Nuttall

l: litro

L.: Linné

LMA: Las Malvinas

log: logaritmo en base 10

LPE: largo del pecíolo

LR: longitud del sistema radicular

LVP: longitud del vástago principal

p/v: peso/volumen

PA: plantas poco afectadas por *Veticillium*

PEG: polietilenglicol

PFdf: peso fresco inicial de los discos foliares

pH: índice que expresa el nivel de acidez o alcalinidad de una disolución

PPT: precipitaciones

PSel: poblaciones segregantes seleccionadas por mayor desarrollo a temperatura subóptima durante germinación-V2

PScip: peso seco de las cipselas

PSdf: peso seco de los discos foliares

PTdf: peso con máxima turgencia de los discos foliares

QTL: quantitative traits loci

R: resistente a SuCMoV

Re::respuesta relativa en condición de estrés

R1: inflorescencia visible, las bracteadas inmaduras parecen una estrella

R<sup>2</sup>: Coeficiente de regresión, cociente entre la suma de cuadrados del modelo y el total de la suma de cuadrados

R2: botón floral a menos de dos centímetros de la última hoja

R3: botón floral a más de dos centímetros de la última hoja

R4: flores liguladas visibles

R5.10: antes del 100 % de las flores tubulares  
R6: fin de floración  
R7: envés del capítulo amarillo pálido  
R8: envés del capítulo amarillo  
R9: madurez fisiológica  
RA: vástago con ramificación apical  
RB: vástago con ramificación basal  
REND: rendimiento individual por planta  
RIV: Río Cuarto  
RR: planta tolerante a SuCMoV-C  
RT: ramificación total  
RUD : poblaciones ruderales argentinas de *H. annuus*  
S: latitud Sur  
SA: plantas severamente afectadas por *Verticilium*  
SG: stock genético  
SG:ACEITE: stock genético con rasgos novedosos de calidad de aceite  
SG:RIV-FS: stock genético con resistencia a deficit hídrico  
SG:SuCMoV: stock genético resistente a SuCMoV-C  
SG:TF: stock genético tolerante a temperatura subóptima durante la etapa de implantación del girasol  
sib: cruzamientos entre individuos hermanos  
SMN: Servicio Meteorológico Nacional. Argentina  
sp.: especies  
SR: vástago sin ramificaciones  
ssp.: subespecie  
SuCMoV: *Virus del moteado clorótico de girasol*  
SuCMoV-C: *Virus del moteado clorótico de girasol* cepa común  
SUF: superficie foliar  
SUFdf: superficie de los discos foliares  
SUR: superficie reproductiva  
SS: planta tolerante a SuCMoV-C  
SV: total semillas vivas  
t: tonelada  
t: prueba t para muestras independientes  
T: temperatura

TA: temperatura del aire

TA-TF: delta entre la temperatura del aire y la temperatura foliar

Tb: temperatura base de germinación

TG: tasa diaria de germinación

TF: temperatura foliar

TMG: tiempo medio de germinación

To: régimen de temperatura óptimo

TP: transpiración

Tso: régimen de temperatura subóptimo

TS: total semillas

TT: planta tolerante a SuCMoV-C

TTC: prueba de tetrazolio

USDA: United State Department of Agriculture

USA: Estados Unidos de América

Vn: estado vegetativo, el número (n) de hojas verdaderas (más de 4 cm de largo) se numera

VF: verdor foliar

VTTC: semillas no germinadas pero viables, determinadas con TTC

X: valor del carácter evaluado

$\bar{X}$ : valor medio del carácter evaluado

W: longitud Oeste

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**



En la actualidad el girasol, *Helianthus annuus* L., es uno de los principales cultivos oleaginosos para la humanidad. Aunque representa menos de una décima parte de los aceites elaborados a nivel mundial, se ubica en el cuarto nivel de importancia después de la soja, palma y colza. Argentina es uno de los cuatro principales países productores y exportadores de aceite de girasol del mundo (USDA 2016).

El girasol se difundió en Argentina en la primera mitad del siglo pasado, cuando presentaba un precio elevado debido a la escasez de productos oleaginosos durante las guerras mundiales. El descubrimiento de la androesterilidad citoplasmática, en la segunda mitad del siglo, facilitó el empleo de cultivares híbridos. El mejoramiento por adaptación y resistencia a enfermedades, contribuyó al aumento del rendimiento medio del país, hasta alcanzar  $1,8 \text{ t ha}^{-1}$ . En 1998, la siembra de girasol alcanzó a 4,2 millones de hectáreas, superficie considerada record nacional (Ingaramo y Feoli 2008).

En el nuevo milenio la superficie del cultivo ha disminuido marcadamente debido al incremento del área cultivada con soja, favorecida por una nueva coyuntura económica. El cambio de rentabilidad relativa originado por un abaratamiento de los aceites vegetales, por sobreoferta de la palma, y al aumento de la demanda de proteínas vegetales valorizó a la soja. Una de las principales fuentes proteicas, cuyo cultivo en labranza cero utilizando variedades resistentes al herbicida glifosato resulta muy seguro (Ingaramo y Feoli 2008).

Esta situación ha ocasionado que el girasol haya sido desplazado hacia zonas marginales del oeste de la región pampeana y al área chaqueña. Allí el rendimiento de la soja es muy azaroso, pues la humedad suele encontrarse en capas profundas del suelo, a las que el girasol accede porque tiene un sistema radicular más desarrollado. El girasol también se ha consolidado en el sudeste de Buenos Aires, donde la temperatura, que está influida por la proximidad del océano, suele ser muy baja para el crecimiento de la soja. En la actualidad la siembra de girasol en Argentina ronda los 1,6 millones de hectáreas, con una producción anual de tres millones de toneladas (MINAGRI 2016).

En nuestro país se observa una baja producción unitaria de girasol, que no ha crecido en los últimos años (MINAGRI 2016). Si bien la genética ha aumentado el rendimiento potencial de los híbridos comerciales (de la Vega *et al.* 2007), ello no se expresa en el promedio nacional debido a que en las regiones de cultivo existen limitaciones por diferentes tipos de estrés.

El estrés se puede definir como un factor ambiental que reduce la tasa de algún proceso fisiológico, por ejemplo el crecimiento, por debajo de la tasa máxima que la planta podría tener en condiciones óptimas (Jones y Jones 1989). Desde el punto de vista agronómico estrés es cualquier fenómeno que limite la productividad o destruya la biomasa de los cultivos (Grime 2002). Los factores naturales que disminuyen la vitalidad de las plantas pueden ser de origen biótico, causado por organismos, o abiótico, causado por factores físicos y químicos (Reigosa y Pedrol 2003). La respuesta inmediata de la planta al estrés es la reducción de la performance. Si el daño no es agudo y no causa muerte, las plantas pueden activar mecanismos de defensa que le permiten recuperar un nuevo estado funcional bajo estrés. Esta respuesta compensatoria le permite a la planta mantener relativamente constante la tasa del proceso fisiológico a pesar de la ocurrencia del estrés. Si la planta es exitosa en sobreponerse, debe tener algún grado de resistencia a los efectos del estrés (Lambers *et al.* 2008). La resistencia implica la presencia de rasgos que ya están presentes o son activados en respuesta a una condición estresante controlados genéticamente por uno o más genes (heredable) (Agrios 2005; Blum 2016 a).

Levitt (1980) y Blum (2016 a) concuerdan en que los mecanismos de resistencia de las plantas al efecto del estrés abiótico son de dos tipos: aquellos que evitan el efecto del estrés en el tejido, por ejemplo las plantas que mantienen sus tejidos hidratados aún bajo déficit hídrico, o aquellos que lo toleran, conviven con el estrés y tienen la capacidad de prevenir, disminuir o reparar los daños causados por la condición estresante, por ejemplo las plantas que mantienen el desarrollo bajo temperaturas subóptimas. Respecto a los factores estresantes de origen biótico, Agrios (2005) distingue tres tipos de resistencias de las plantas: resistencia no-huésped, la especie vegetal está fuera del rango del patógeno; resistencia verdadera posee genes de resistencia directamente dirigidos hacia los genes de avirulencia del patógeno y resistencia aparente, la especie es susceptible al patógeno pero escapa o tolera la infección. Las plantas tolerantes tienen la capacidad de tener una performance aceptable aún cuando se encuentran colonizadas por el patógeno.

Partiendo de lo anterior, se puede inferir que estrés es el factor ambiental, ya sea de origen biótico o abiótico, que desencadena una alteración perjudicial en el funcionamiento del metabolismo de la planta; y que la resistencia está dirigida a impedir o evitar, por ejemplo la deshidratación o la colonización por un patógeno, o suavizar o

tolerar, por ejemplo mediante la activación de mecanismos de detoxificación o mantenimiento del verdor foliar, los efectos del estrés sobre el organismo (Agrios 2005; Blum 2016 b). En esta tesis, para simplificar la lectura, se entiende como resistencia o tolerancia de una planta o población al estrés, a la capacidad para sobreponerse a la condición estresante. Queda así establecido que la resistencia no está dirigida directamente al estrés, sino al efecto que este causa sobre el funcionamiento del metabolismo, ya que una condición estresante particular puede producir numerosos efectos diferentes y distintos estreses pueden producir el mismo efecto. Por ejemplo, elevada salinidad en el suelo produce deshidratación celular y toxicidad; pero el efecto de deshidratación celular también es producido por el déficit hídrico (Medrano y Flexas 2003 b; Willadino y Camara 2003).

En Argentina el estrés por déficit hídrico es la principal causa de la baja productividad del cultivo de girasol (Aguirrezábal 2003). Si bien el girasol puede completar su ciclo con 550 mm de lluvia (Maggiora *et al.* 2000), cuando existe alta disponibilidad hídrica es capaz de aumentar el consumo hasta alcanzar  $10 \text{ mm día}^{-1}$  (ASAGIR 2016). El girasol posee elevada superficie foliar, alta conductividad hídrica y un sistema radical muy desarrollado que explora horizontes del suelo profundos (Aguirrezábal 2003). El consumo del agua edáfica, almacenada durante el barbecho, desde la siembra disminuye progresivamente las reservas de agua del perfil explorado por las raíces causando si no llueve deficiencia hídrica durante la etapa reproductiva, estrés terminal. La mayor reducción del rendimiento se observa cuando el estrés hídrico ocurre alrededor de la floración y el inicio del llenado de granos (Andrade y Sadras 2000, Göksoy *et al.* 2004).

La labranza cero, que en Argentina se ha difundido para adelantar la siembra de soja de segunda en el verano, mejora la eficiencia de uso del agua de los cultivos (Unger *et al.* 1991; Alvarez y Steinbach 2009). Durante 2010, el 78% de la superficie implantada con girasol utilizó esta técnica (BCBA 2016). Sin embargo, los suelos en labranza cero se calientan más lentamente durante la primavera y tardan en superar la temperatura basal de  $4^{\circ}\text{C}$  (Villalobos y Ritchie 1992). En esas condiciones el crecimiento es lento, por lo que aumenta el riesgo de pérdida de plantas (González Montaner y Di Napoli 2004; Lange 2012). Es por ello que en labranza cero se recomienda atrasar la fecha de siembra del girasol (Kozar *et al.* 2007; Sarkar *et al.* 2007), situación que a veces limita el potencial productivo de los cultivos. Resultaría de utilidad obtener genes que confieran

una alta tasa de crecimiento y desarrollo a bajas temperaturas en etapas tempranas del cultivo para aprovechar todas las ventajas de esta técnica de siembra.

En otros casos, la producción del girasol está limitada por factores bióticos, como enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias y algunos virus. La cepa común (C) del *Sunflower chlorotic mottle virus* (SuCMoV), agente causal del moteado clorótico del girasol, causa la virosis más difundida en el país. La infección de este virus disminuye significativamente los parámetros agronómicos (Lenardon *et al.* 2001). El SuCMoV constituye un problema fitosanitario emergente que merece el diseño de estrategias de manejo en virtud de los potenciales riesgos para la producción de girasol.

La principal finalidad del girasol y el valor del cultivo están ligados a la producción de aceite de calidad, principalmente determinada por su composición acídica. La proporción de los distintos ácidos grasos influye sobre las propiedades fisicoquímicas del aceite, determinando su aptitud para cada destino final (Kaya *et al.* 2012). El aceite de girasol se utiliza principalmente para consumo humano directo (Seiler 2007). Tradicionalmente el aceite de girasol ha sido considerado como un aceite polinsaturado, debido a su alto contenido de ácido linoleico (60-66%) (Fernández Martínez *et al.* 2007; Bervillé 2010).

La demanda industrial de aceites estables a altas temperaturas de cocción se orienta a cultivares con alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados, con alto contenido de ácido oleico, denominados "alto oleico" (Ingaramo y Feoli 2008). También una elevada proporción de ácidos grasos saturados es deseable para la elaboración de margarinas, porque ello reduce el uso de hidrogenación, proceso que genera variantes químicas *trans* (Jan y Seiler 2007), que son insalubres. Girasoles con mayor contenido de ácido saturados, disminuirían la necesidad de hidrogenación. Entre los ácidos saturados, el ácido esteárico posee un efecto neutro sobre la formación de colesterol maligno (FAO y FINUT 2012).

En la segunda mitad del siglo pasado, dos especies anuales parientes del girasol se han naturalizado en la región central de nuestro país; *Helianthus petiolaris* Nutt. y *H. annuus* L. (Poverene *et al.* 2002). Ambas especies son originarias de Estados Unidos de América, donde se encuentran distribuidas en un amplio rango geográfico (Seiler y Rieseberg 1997).

El género *Helianthus* (familia *Asteraceae*) es muy diverso e incluye especies diploides, tetraploides y hexaploides. La especie silvestre *H. annuus* es anual, diploide, con número cromosómico básico  $x = 17$ . Esta especie es el antecesor silvestre del girasol, domesticado hace 4000 años en la parte central y este de Estados Unidos de América (Heiser 1998; Burke *et al.* 2002; Seiler y Jan 2010).

Las poblaciones de *H. annuus* naturalizadas en Argentina son fenotípicamente similares a la forma silvestre nativa de Estados Unidos de América, y presentan un alto grado de variabilidad (Presotto 2007). Un estudio mediante 41 características morfológicas, 4 fenológicas y 12 descriptores químicos de las poblaciones naturalizadas en Argentina reveló que estas muestran tres cuartos de la variabilidad presente en las poblaciones del centro de origen. Adicionalmente se observaron nuevas combinaciones y rasgos ausentes en las poblaciones de Estados Unidos de América estudiadas, como por ejemplo la composición lipídica y el extenso ciclo ontogénico de una población localizada en la provincia de Entre Ríos (Presotto *et al.* 2009; Cantamutto *et al.* 2010 b, c).

Las poblaciones de *H. annuus* ruderales de Argentina poseen una alta biodiversidad con rasgos novedosos, probablemente desarrollados con la contribución del flujo genético entre esta especie, el girasol cultivado y/o la especie *H. Petiolaris* (Poverene *et al.* 2004). Además, probablemente durante la naturalización en nuestro país, la especie haya desarrollado mecanismos para sobreponerse a limitantes bióticas y abióticas locales (Hierro *et al.* 2005). Algunos de estos atributos resultarían útiles para la mejora del cultivo.

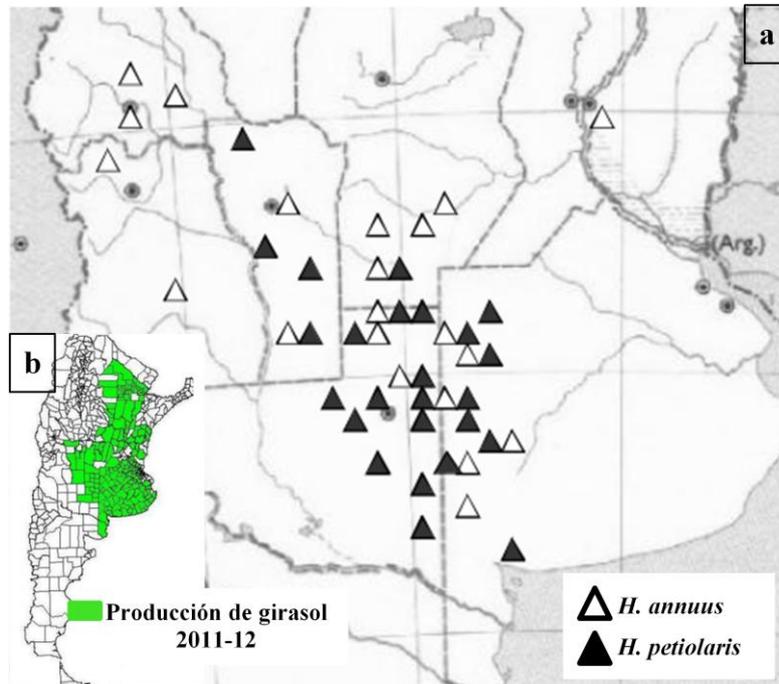
El complejo de especies silvestres ha demostrado ser un recurso genético útil para la mejora del girasol. La diversidad genética de las especies silvestres podría incrementar la heterosis para componentes del rendimiento, modificar la arquitectura de la planta, incorporar tolerancia a factores abióticos (sequía, frío, salinidad) y resistencia a enfermedades virósicas (Jan y Seiler 2007), permitiendo que el cultivo se convierta y permanezca viable económicamente (Thompson *et al.* 1981). La especie *H. annuus* constituye un recurso genético fácilmente transferible al girasol (Burke *et al.* 2002). Esta especie ha provisto genes de resistencia a enfermedades (Báez y Mácola 1954; Putt y Sackston 1957), a insectos (Rogers 1992) y tolerancia a herbicidas (Al Khatib *et al.* 1998). El germoplasma silvestre también representa un recurso potencialmente valioso para mejorar la calidad de aceite en girasol (Seiler 2004, 2007).

En Argentina las poblaciones de *H. annuus* se ubican al oeste de la región pampeana, entre 31,8° y 38,8° de latitud Sur y 60,68° y 65,48° de longitud Oeste. Las plantas crecen en parches en hábitats disturbados por el hombre, como bordes de rutas y caminos vecinales, zanjas, cercas y en los márgenes de áreas de cultivo en condiciones de secano en la provincia de Buenos Aires, La Pampa y Córdoba. En Mendoza se ubican en parches distribuidas sobre las márgenes de canales de irrigación y en Entre Ríos sobre el río Diamante (Poverene *et al.* 2002; Cantamutto *et al.* 2008 c). Algunas poblaciones de esta especie silvestre coexisten con la especie *H. petiolaris* y con el cultivo de girasol (Figura I) (Poverene *et al.* 2004). No existen barreras reproductivas entre *H. annuus* y el cultivo de girasol (Snow *et al.* 1998; Burke *et al.* 2002; Ureta *et al.* 2008; Presotto *et al.* 2011). En cambio entre *H. annuus* silvestre y cultivado, y *H. petiolaris* el flujo génico es menor, debido a cierta incompatibilidad a nivel meiótico, aunque la hibridación es posible (Heiser 1947; Rieseberg *et al.* 1999; Cantamutto *et al.* 2007 b; Gutierrez *et al.* 2010). En Argentina, en zonas donde estas especies son simpátricas se han observado individuos con características intermedias entre las especies, indicando hibridación (Poverene *et al.* 2009).

Las plantas de las poblaciones de *H. annuus* ruderales de Argentina (RUD) son profusamente ramificada, poseen capítulos pequeños, de maduración desuniforme, frutos (cipselas) dehiscentes y un extenso período de floración (Presotto *et al.* 2009).

Para el desarrollo de este trabajo fueron elegidas seis poblaciones RUD estables, observadas durante cinco años o más en el mismo sitio geográfico, y conformadas por más de 300 individuos. Las seis RUD elegidas se denominaron Adolfo Alsina, Carhué, Colonia Barón, Diamante, Las Malvinas y Río Cuarto, en función de su localización geográfica (Tabla I). En conjunto, representan la variabilidad observada en las poblaciones de *H. annuus* naturalizadas en Argentina (Cantamutto *et al.* 2010 b).

**Figura I:** Ubicación de las poblaciones naturalizadas de *H. annuus* y *H. petiolaris* en relación con el área de producción de girasol en territorio argentino. Cada símbolo representa un departamento provincial donde la especie se encuentra presente. Origen: a: Poverene *et al.* 2002; b: MINAGRI 2016.



Las poblaciones se localizan en tres regiones ecológicas de Argentina, denominadas Pampa, Espinal y Monte de Llanuras y Mesetas según Burkart *et al.* (1999) (Tabla I). La región Pampa, se encuentra en el centro del país lindante al este con el océano Atlántico, es una llanura dominada por gramíneas. El clima es templado húmedo a subhúmedo hacia el oeste. La región Espinal, linda con el oeste de la región Pampa, es una llanura levemente ondulada, dominada por pastos, árboles y arbustos xéricos. El clima es cálido y húmedo al norte y templado y seco con marcados déficits hídricos hacia el oeste y sur. En las regiones Pampa y Espinal predominan los suelos de orden principal Molisol. La región Monte de Llanuras y Mesetas linda al este con el centro y sur de la región Espinal y al oeste con la cordillera de Los Andes. El clima es templado-árido con escasas precipitaciones. La vegetación es pobre predominando arbustos bajos xéricos y cactáceas. Los suelos que predominan pertenecen al orden principal Entisoles (Burkart *et al.* 1999; Naumann y Madariaga 2003). Desde el este de la región Pampa las precipitaciones decrecen desde más de 1000 mm a menos de 400 mm al oeste de la región Monte (SMN 2016).

**Tabla I:** Acrónimo, localización geográfica, región ecológica y tamaño de las poblaciones de *H. annuus* utilizadas en el presente trabajo.

Población	Acrónimo	Provincia	Localización geográfica <sup>1</sup>		Región ecológica <sup>2</sup>	Tamaño poblacional <sup>3</sup> (núm.)
			Latitud	Longitud		
Adolfo Alsina	AAL	Buenos Aires	37° 16´	62° 60´	Espinal	>3000
Carhué	CAR	Buenos Aires	36° 16´	62° 56´	Pampa	>300
Colonia Barón	BAR	La Pampa	36° 11´	63° 54´	Pampa	>3000
Diamante	DIA	Entre Ríos	32° 04´	60° 39´	Espinal	>3000
Las Malvinas	LMA	Mendoza	34° 47´	68° 15´	Monte	>300
Río Cuarto	RIV	Córdoba	33° 10´	64° 20´	Espinal	>3000

<sup>1</sup> Presotto 2007. <sup>2</sup> Burkart *et al.* 1999. <sup>3</sup> Cantamutto 2008 a.

Las poblaciones ruderales Adolfo Alsina, Carhué y Colonia Barón se localizan en el límite entre la región Espinal y Pampa. Adolfo Alsina se encuentra emplazada en la ruta provincial 60 en cercanías de Colonia San Miguel, en el partido de Adolfo Alsina al sur de la provincia de Buenos Aires (Poverene *et al.* 2002). Es una población densa, la componen más de 3000 individuos (Cantamutto 2008 a; Tabla I). Bajo condiciones óptimas, las plantas tienen una altura de 2,3 m y el ciclo ontogénico tiene una duración de 150 días, con 55 días de floración. Esta población presenta numerosos signos de introgresión con girasol cultivado, como presencia de un capítulo de mayor tamaño en el vástago principal, capítulos secundarios grandes y filarias anchas (Presotto 2007). Los datos climáticos disponibles de la ciudad más próxima a la población indican una temperatura media del mes más frío, julio, de 7,2°C y del mes más cálido, enero, de 23,7°C, con una precipitación anual de 630 mm, las precipitaciones del trimestre más cálido no superan los 250 mm (de Fina 1992). Los suelos que predominan en la zona son una asociación de Argiudol típico, franco fino, somero con Haplustol éntico, somero. La escasa profundidad por presencia de tosca es la principal limitante junto con la baja retención hídrica del suelo (Visor GeoINTA 2016; Tabla II).

Carhué se encuentra en cercanías de la localidad que lleva este nombre en la provincia de Buenos Aires, sobre la banquina de caminos vecinales. Es una población no muy extensa (Cantamutto 2008 a; Tabla I). Bajo condiciones óptimas, las plantas tienen una altura de 2,4 m y el ciclo ontogénico tiene una duración de 140 días, con 50 días de floración (Presotto 2007). Los datos climáticos disponibles de la ciudad más próxima a la población indican una temperatura media del mes más frío, julio, de 7,2 °C y del mes más cálido, enero, de 23,8°C, con una precipitación anual de 632 mm; las precipitaciones del trimestre más cálido no superan los 250 mm (de Fina 1992). Los suelos que predominan en la zona son una asociación de Apludol éntico y típico, de textura franco arenosa (Visor GeoINTA 2016; Tabla II).

Colonia Barón se ubica al norte de la provincia de La Pampa en las proximidades de la localidad de Colonia Barón. Es una población numerosa, compuesta por más de 3000 individuos (Tabla I). Bajo condiciones óptimas las plantas tienen una altura cercana a dos metros y hojas pequeñas. El ciclo ontogénico tiene una duración de 147 días, aunque su período de floración es relativamente extenso, 50 días (Presotto 2007). Esta población convive con una población de *H. petiolaris* y parece haber intenso flujo genético entre ambas, ya que se pueden observar plantas de tipo intermedio en el lugar (Cantamutto *et al.* 2007 b). Los datos climáticos de la localidad más próxima a la población Colonia Barón refieren que la temperatura media del mes más frío, julio, es de 7,6°C y del mes más cálido, enero, de 24,1°C; la precipitación anual es de 574 mm, menos de 200 mm precipitan durante la estación estival (de Fina 1992). En la zona predominan suelos de textura franco arenosa clasificados como Haplustoles énticos, cuya principal limitante es la moderada profundidad y retención hídrica (Visor GeoINTA 2016; Tabla II).

Las poblaciones ruderales Diamante y Rio Cuarto se ubican en la región ecológica del Espinal. Diamante está emplazada en la barranca del río Diamante en la provincia de Entre Ríos. Es una población extensa con más de 3000 individuos (Tabla I). Las plantas son de porte arbustivo, con numerosas ramas que sobrepasan la altura del vástago principal. Sin limitantes ambientales, la altura es menor a dos metros y puede llegar a producir más de 100 capítulos por planta. Se destaca por presentar un ciclo ontogénico inusualmente largo, de 200 días, de los cuales la floración comprende aproximadamente 110 días (Presotto 2007). Adicionalmente, la composición lipídica del aceite de sus semillas tiene alto contenido de ácidos saturados, principalmente de ácido esteárico más

ácido palmítico (Cantamutto *et al.* 2008 a). Los registros meteorológicos de la localidad más próxima a la población, indican que la temperatura media del mes más frío es de 11,2°C y del mes más cálido es de 24,8°C. Las precipitaciones son abundantes, cercanas a 1000 mm anuales, precipitando cerca de un tercio durante la estación estival (de Fina 1992). Esta población yace sobre suelos franco limosos de escaso drenaje, caracterizados como Argiudoles ácuicos (Visor GeoINTA 2016; Tabla II).

La población ruderal Río Cuarto se ubica al sur de la provincia de Córdoba en cercanías de la ciudad de Río Cuarto. Es una población extensa, de más de 3000 individuos (Tabla I). Bajo condiciones óptimas las plantas son de gran porte, con una altura de casi tres metros, numerosos capítulos, y su ciclo ontogénico tiene una duración de 150 días, con un período de floración de 40 días (Presotto 2007). En el lugar de emplazamiento de la población, la temperatura media del mes más frío es de 8,8°C y del mes más cálido es de 23,5°C. La precipitación anual es de 795 mm, con una participación estival mayor a 300 mm (de Fina 1992). En la zona predominan los suelos de textura franca limosa, caracterizados como Natracuoles y Natracualfes típicos y Haplustoles énticos asociados en complejos (Visor GeoINTA 2016; Tabla II).

La población ruderal Las Malvinas se sitúa en la ecoregión del Monte, al sur de la localidad que lleva este nombre, en el centro de la provincia de Mendoza (Tabla I). Las Malvinas es una población no muy extensa. Sin limitantes ambientales, las plantas son de gran porte, altura de 2,7 m, con numerosas hojas de gran tamaño. Tienen una iniciación floral tardía y un período de floración corto, 30 días. El ciclo ontogénico tiene una duración de 150 días. Presenta signos de introgresión con girasol cultivado, plantas con capítulo principal, filarias anchas y cipselas estriadas (Presotto 2007). Los datos del clima de la ciudad más próxima a la población indican una temperatura del mes más frío, julio, de 7,0°C y del mes más cálido, enero, de 23,1°C. La precipitación anual es de 238 mm (de Fina 1992). Predomina la asociación entre suelos Aridisoles Paleortides típico y Entisoles terrifluventes típicos, de textura superficial franco arenosa (Visor GeoINTA 2016; Tabla II).

En el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, a partir del 2005 comenzó a explorarse la tolerancia a baja temperatura durante la etapa de implantación del girasol en germoplasma argentino *H. annuus*. Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento y desarrollo de algunas RUD criadas en condiciones de

5/15°C (noche/día, fotoperíodo 12 h) durante la etapa de germinación-V2 (Cantamutto *et al.* 2007 a). Mediante seis ciclos de selección, multiplicación y cruzamiento con líneas puras, se han obtenido algunos genotipos segregantes promisorios para este carácter.

En 2005, también comenzó la selección del germoplasma naturalizado de *H. annuus* por resistencia a la cepa común del SuCMoV (SuCMoV-C). Algunas poblaciones mostraron plantas con ausencia de sintomatología o síntomas muy atenuados cuando se realizó la inoculación mecánica del virus (Cantamutto *et al.* 2007 a). Cinco ciclos de selección de plantas de comportamiento destacado, multiplicación y cruzamientos con líneas puras, culminaron con el desarrollo de un germoplasma con resistencia a SuCMoV-C, denominado S10. A pesar de los cinco ciclos de selección, S10 presentaba falta de fijación del carácter de resistencia a SuCMoV-C. Ello se adjudicó a que la elevada autoincompatibilidad impidió la autofecundación, por lo que la selección y el avance generacional se realizó mediante polinización controlada entre plantas hermanas (Cantamutto *et al.* 2010 a).

En cuanto a composición acídica, se halló que la población Diamante de la provincia de Entre Ríos poseyó un perfil acídico diferente a las restantes RUD, principalmente se destacó por una alta proporción de ácido esteárico y palmítico (Cantamutto *et al.* 2008 b). Se consideró que esta población podría utilizarse para obtener rasgos novedosos de calidad de aceite.

**Tabla II:** Descripción del suelo y el clima del sitio geográfico de procedencia de las cinco poblaciones ruderales de *Helianthus annuus* de Argentina utilizadas en el presente trabajo. D.: diciembre. E.: enero. F.: febrero.

Población	Datos del sitio							
	Suelo <sup>1</sup>				Clima <sup>2</sup>			
	Tipo de suelo	Textura superficial del suelo	Principales limitantes edáficas	Altura sobre el nivel del mar (m)	Temperatura media (°C)		Precipitación media (mm)	
				Mes más cálido (enero)	Mes más frío (julio)	Anual	Trimestre más caluroso (D., E.y F.)	
<b>Adolfo Alsina (AAL)</b>	Asociación entre Haplustol típico y Hargiudol éntico	Franco	Poca profundidad y baja retención hídrica	114	23,7	7,2	630	207
<b>Colonia Barón (BAR)</b>	Haplustol éntico	Franco arenoso	Moderada profundidad y moderada retención hídrica	151	24,5	7,6	574	193
<b>Carhué (CAR)</b>	Asociación entre Hapludol éntico y típico	Franco arenoso	Susceptibilidad erosión eólica	112	23,8	7,2	632	213
<b>Diamante (DIA)</b>	Argiudol ácuico	Franco limoso	Drenaje moderado	7	24,8	11,2	936	294
<b>Las Malvinas (LMA)</b>	Asociación entre Aridisol Paleortides típico y Entisoles Terrifluventes típicos	Franco arenoso	Poca profundidad	1244	23,5	6,3	238	83
<b>Río Cuarto (RIV)</b>	Complejo de Natracuoles y Natracualfes típicos y Haplustoles énticos	Franco limoso	Suelos alcalinos, drenaje insuficiente	243	23,5	8,8	795	329

<sup>1</sup>: Visor GeoINTA (2016)

<sup>2</sup> Datos climáticos disponibles (de Fina 1992) de la localidad más cercana a la ubicación geográfica de las poblaciones RUD. Localidad más cercana de AAL, Tres Lagunas, de BAR, Colonia barón, de DIA, Diamante, de LMA, Las Malvinas y de RIV, Río Cuarto.

La finalidad de esta tesis fue la búsqueda, caracterización y selección de material genético que pueda ser utilizado como fuente de tolerancia, resistencia y donante de rasgos de interés para ser incorporados en líneas avanzadas dentro de programas de mejoramiento del girasol.

Por lo expuesto anteriormente se plantearon las siguientes hipótesis específicas de trabajo:

Hipótesis 1: Las poblaciones segregantes de girasol seleccionadas por mayor desarrollo durante el período germinación-V2 bajo temperatura subóptima (PSel) poseen una mejora en la performance bajo esa condición limitante para el girasol, respuesta asociada a la expresión de rasgos morfológicos y/o fisiológicos específicos.

Hipótesis 2: Las poblaciones ruderales argentinas de *H. annuus* (RUD) poseen resistencia a déficit hídrico desde la iniciación de la etapa reproductiva y hasta la madurez fisiológica que les permite su supervivencia y reproducción bajo estrés hídrico; respuesta asociada a rasgos morfológicos y/o fisiológicos distintivos que le otorgan capacidad para resistir a esta condición estresante.

Hipótesis 3: Como la baja frecuencia de individuos resistentes a SuCMoV-C del material segregante S10 se debe a su bajo nivel de homocigosis por su bajo nivel de autofecundación, el cruzamiento de S10 con líneas endocriadas y la selección recurrente por resistencia a SuCMoV-C utilizando autofecundación aumentará la frecuencia de individuos resistentes a SuCMoV-C en generaciones avanzadas del compuesto genético.

Hipótesis 4: Las particularidades del perfil ácido de DIA son debidas a la expresión genética y se expresarán en la descendencia de sus cruza controladas con líneas endocriadas.

Hipótesis 5: Los stocks genéticos de *H. annuus* con atributos de interés para la mejora del girasol generados durante el desarrollo de la tesis presentan características fenotípicas particulares que los distingue, además del rasgo principal por el cual fueron seleccionados.

En consecuencia, los objetivos específicos fueron:

Objetivo 1: Evaluar el crecimiento y desarrollo de las PSeI bajo temperatura subóptima durante las etapas de germinación-V2, e identificar atributos morfológicos y/o fisiológicos vinculados con la tolerancia a esa condición estresante.

Objetivo 2: Explorar la performance de las RUD, mediante la caracterización de su desarrollo y producción en condiciones limitantes de abastecimiento hídrico desde la iniciación de la etapa reproductiva y hasta madurez fisiológica con el fin de determinar su capacidad para resistir condiciones de déficit hídrico; e identificar, rasgos morfológicos y/o fisiológicos ligados a resistencia a déficit hídrico durante la etapa reproductiva.

Objetivo 3: Obtener un stock genético con alta frecuencia de individuos con resistencia a SuCMoV-C mediante selección recurrente de plantas resistentes en ciclos sucesivos de autofecundación de plantas inoculadas, en generaciones posteriores al cruzamiento entre plantas resistentes del material segregante S10 y una línea endocriada.

Objetivo 4: Evaluar la composición de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico del aceite de granos de la progenie de cruzamientos entre DIA y líneas endocriadas.

Objetivo 5: Descripción fenotípica de los stocks genéticos de *H. annuus* con atributos de interés para la mejora del girasol generados durante el desarrollo de la tesis.

# **CAPÍTULO 1:**

**CONFORMACIÓN DE UN STOCK GENÉTICO  
CON TOLERANCIA A TEMPERATURA  
SUBÓPTIMA DURANTE EL PERÍODO DE  
IMPLANTACIÓN DEL GIRASOL**



## INTRODUCCIÓN

Históricamente, la principal provincia productora de girasol ha sido Buenos Aires, con una contribución cercana al 60% del total nacional. Aunque esta posición relativa se mantiene, en los últimos 13 años se operó una migración de la siembra de girasol hacia zonas marginales. La región Triguera II Sur disminuyó la participación relativa un 30%, mientras que la región IV y V Sur aumentaron el aporte en superficie cultivada en más del 10%. En la última década la provincia de Córdoba disminuyó la superficie cultivada con girasol, mientras que en Chaco y La Pampa operó un proceso inverso (MINAGRI 2016).

El girasol aventaja agrónomicamente a la soja en zonas marginales del oeste de la región pampeana y al área chaqueña. Allí el rendimiento de la soja es muy variable, pues la humedad suele encontrarse en capas profundas del suelo, a las que el girasol accede debido al sistema radicular más desarrollado. El girasol también se ha consolidado en el sudeste de Buenos Aires, donde la temperatura, influida por la proximidad del océano, suele ser muy baja para el crecimiento de la soja (Díaz Zorita *et al.* 2003).

Actualmente, el 70% de la siembra de girasol se realiza con la técnica de labranza cero. Las ventajas de esta técnica son la disminución de la erosión hídrica y eólica, y el mejoramiento de la eficiencia de uso del agua (González Montaner *et al.* 2010; Aapresid 2016). Sin embargo en siembras tempranas de primavera, los suelos en labranza cero se calientan más lentamente (Villalobos y Ritchie 1992). Por ello, cuando se emplea esta técnica se recomienda atrasar la fecha de siembra del girasol (Cook *et al.* 2006; Sarkar *et al.* 2007), aunque a veces ello limita el potencial productivo de los cultivos. También se emplean semillas seleccionadas por vigor (Agüera *et al.* 1997; Fernández y Re 2004), con alta capacidad de enraizamiento (Seiler 1998). Algunas empresas aplican tratamiento de semillas con productos químicos que confieren protección a los patógenos e insectos. También se utiliza el *priming*, que aumenta el vigor de la semilla. Estas técnicas conllevan mayores costos de producción (Ashraf y Foolad 2005; Bajehbaj 2010).

Durante la implantación, el estrés por baja temperatura es uno de los estreses más frecuentes en siembras tempranas de girasol. Se aconseja realizar la siembra del cultivo cuando la temperatura a 5 cm debajo de la superficie del suelo supera 10°C. Si ello no se

cumple, el vigor de las plántulas es menor, disminuye la eficiencia de implantación y a consecuencia de ello el rendimiento del cultivo (Díaz Zorita *et al.* 2003).

Iriarte (2001) recomienda la siembra de girasol en Tres Arroyos a partir de mediados de octubre, cuando la temperatura del suelo alcanza 15°C. Cuando la siembra se realiza a 10°C, el crecimiento inicial es lento, por lo que aumentan las pérdidas de plantas (González Montaner y Di Napoli 2004). Murcia *et al.* (2006) determinaron que a 10°C la germinación de diez híbridos de girasol de Argentina se atrasó cuatro días respecto a lo observado a 25°C.

Cuando la temperatura del suelo es menor a 10°C se demora excesivamente la emergencia y aumentan las pérdidas de plantas por patógenos o plagas (Raventos 1985; Fonseca 1987; Barrosa *et al.* 2004). En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, algunas plagas emergentes como la babosa (*Deroceras* sp.) y el bicho bolita (*Armadillidium* sp.) pueden reducir drásticamente la densidad de plantas durante la implantación y así afectar el rinde (González Montaner *et al.* 2010). Ello es más crítico en el sistema de labranza cero ya que la germinación y emergencia se desarrollan con mayor presión de insectos del suelo (Pereyra *et al.* 2001).

La calidad fisiológica de las semillas determina la tasa de germinación e influyen sobre la implantación del cultivo de girasol. En la conformación de la calidad fisiológica participa la constitución genética y el ambiente materno (condiciones nutricionales y climáticas) experimentado durante el crecimiento y desarrollo de la semilla. Las prácticas de almacenamiento también afectan la calidad fisiológica de la semilla (Aguirrezábal *et al.* 1996; Balešević Tubić *et al.* 2005; Mrdja *et al.* 2012).

La utilización de semillas con baja calidad fisiológica desmejora la densidad y afecta la uniformidad de la implantación del girasol (Murcia *et al.* 2001). El tamaño, peso y morfología de la semilla pueden impactar sobre el establecimiento del cultivo bajo condiciones de siembra adversas. El empleo de semillas con alto peso seco unitario produce plántulas más grandes (Hocking y Steer 1989; Murcia *et al.* 2006). Cuando la siembra posiciona la simiente a más de 6 cm de profundidad, puede observarse que las semillas de mayor peso muestran una mayor tasa de emergencia. Sin embargo, ello no acontece en siembras superficiales (Radford 1977; Hocking y Steer 1989; Trápani *et al.* 2003).

El girasol puede presentar limitaciones para la germinación impuesta por la dormición de las semillas (Pallavi *et al.* 2010). Se considera que se trata de dormición primaria (Baskin y Baskin 2004; Ruiz *et al.* 2013), que se observa hasta dos meses después de la cosecha (Maiti *et al.* 2006; Pallavi *et al.* 2010; Bazin *et al.* 2011). Sin embargo, los biotipos espontáneos de la especie pueden tener un período de dormición de mayor duración (Presotto *et al.* 2014). El pericarpio y la cubierta seminal controlan la dormición del girasol doméstico y del congénere silvestre, aunque también se ha observado que existe control hormonal (Jan y Chandler 1985; Corbineau *et al.* 1990; Le Page Degivry *et al.* 1990; Seiler 1998; Corbineau y Côme 2003; Bodrone *et al.* 2012; Presotto *et al.* 2014).

La elección de la fecha de siembra se planifica apuntando a la coincidencia del período crítico del cultivo con buenas condiciones ambientales. La fecha de siembra determina el rendimiento potencial del cultivo debido a que define el tamaño, funcionalidad y la duración de las estructuras que capturan los recursos del ambiente (Andrade y Cirilo 2000). Al oeste de la región pampeana, la probabilidad de que las precipitaciones cubran los requerimientos del cultivo durante la etapa crítica es mayor durante la segunda quincena de diciembre. Para que ello ocurra debe utilizarse una fecha de siembra temprana (Andrade y Sadras 2000; Quiroga *et al.* 2008). Se considera que cuando la siembra de girasol se retrasa uno o dos meses luego de mediados de octubre, el rendimiento disminuye más del 20% (Andrade 1995).

Las plantas presentan un rango de temperaturas óptimas en el cual la tasa de crecimiento y desarrollo son máximas (Mahajan y Tuteja 2005). La temperatura ambiental subóptima, en la cual la tasa de desarrollo llega a cero, se conoce como temperatura base. La temperatura supraóptima a partir de la cual se detiene el crecimiento se conoce como temperatura máxima (Trudgill *et al.* 2005).

La temperatura a la cual se produce la muerte de la planta de girasol se encuentra entre 5°C y 6°C bajo cero. Los cultivos de maíz, arroz, tomate, que son más sensibles, mueren a 3°C bajo cero. Por esta razón al girasol se lo considera moderadamente susceptible al daño por bajas temperaturas (Snyder y de Melo Abreu 2005). Se ha estimado que la temperatura base del girasol durante la etapa vegetativa es 4°C. Este valor ha sido ampliamente empleado en modelos de simulación de desarrollo de girasol (Villalobos y Ritchie 1992).

El perjuicio del frío sobre el metabolismo no solo se produce a temperaturas congelantes (menores a 0°C). Temperaturas bajas por encima de 0°C (subóptimas para el desarrollo de la especie) pueden dañar las plantas (Levitt 1980). El daño por frío puede incluir una gran variedad de disfunciones en el metabolismo a nivel celular y de organismo (Mahajan y Tuteja 2005), que implica modificaciones a nivel molecular, bioquímico, fisiológico, morfológico y anatómico (Taiz y Zeiger 2010). Estas modificaciones pueden involucrar diferentes tipos de daños que dependen de la etapa ontogénica, la duración, severidad y de la sensibilidad de la especie vegetal y de cada genotipo en particular al estrés al cual se encuentra expuesto.

Las modificaciones en el metabolismo a nivel celular producido por temperaturas debajo del óptimo incluyen daño en las membranas celulares, como uno de los primeros efectos que se observa en plantas sensibles (Heidarvand y Maali Amiri 2013), debido a un cambio en la fluidez de las mismas, que modifica su normal funcionamiento (Ruelland y Zachowski 2010). Sobre las membranas de los cloroplastos, implica inhibición en la transferencia de electrones y fotooxidación de componentes del aparato fotosintético, como clorofilas (Allen y Ort 2001), lo que disminuye la eficiencia fotosintética (Venema *et al.* 1999, 2005; Hund *et al.* 2008). El síntoma visible es la pérdida del color verde. Allinne *et al.* (2009) observaron en girasol desarrollado a 12,4°C que la eficiencia fotosintética y el verdor de las hojas era significativamente menor que aquellos que eran cultivados a temperaturas mayores a 15°C.

Las alteraciones en las membranas celulares pueden detectarse a través del cambio en la fuga de electrolitos desde las células (Uemura *et al.* 1995; Venema *et al.* 1999; Campos *et al.* 2003). En girasol, el crecimiento a temperaturas menores a 15°C, aumentó hasta 20% la fuga de electrolitos (Allinne *et al.* 2009). Heidarvand y Maali Amiri (2013) detectaron un aumento en la fuga de electrolitos de plántulas de garbanzo al inicio de la exposición al estrés producido por baja temperatura. También ello ha sido observado en cultivares sensibles a estrés por baja temperatura de café (Campos *et al.* 2003).

Las temperaturas subóptimas durante la germinación y emergencia disminuyen las tasas de estos procesos y puede causar degeneración de ápices y muerte de las plantas (Ruelland y Collin 2012).

La temperatura ambiental también afecta a etapas más avanzadas del desarrollo. El descenso de la temperatura ambiental puede afectar la tasa relativa de crecimiento aéreo (8-83%), debido a que se reduce la tasa de desarrollo de primordios foliares (Andrade *et al.* 2000) y de expansión del área foliar, lo que afecta el peso seco de las plantas (Venema *et al.* 1999, 2005; Hund *et al.* 2008). En girasol, la disminución del peso en plantas juveniles y adultas fue de más del 80% cuando fueron expuestas a temperaturas menores a 15°C (Seiler 1998; Allinne *et al.* 2009). El desarrollo del área específica foliar (área foliar por unidad de peso) del girasol disminuyó significativamente bajo temperatura subóptima (Allinne *et al.* 2009), lo que puede significar cambios morfológicos y fisiológicos, que determinen adaptación a temperaturas subóptimas. En maíz, las hojas que a temperatura subóptima presentaban menor área específica, presentaban mayor verdor y eficiencia fotosintética (Hund *et al.* 2005).

La temperatura también afecta el crecimiento de las raíces. Se han observado reducciones en la longitud de las raíces entre, 36-92% (Hund *et al.* 2008), peso y tasa de crecimiento radicular a temperatura subóptima. Durante el desarrollo inicial de la plántula de girasol hasta el segundo par de hojas, el crecimiento de las raíces está muy influenciado por la temperatura (Seiler 1998), luego el desarrollo principalmente se encuentra ligado a la intercepción lumínica (Aguirrezábal y Tardieu 1996). Seiler (1998) determinó que la temperatura óptima de crecimiento se encuentra en el rango 25-30°C, poco crecimiento ocurre a 10, 15 y 40°C.

Las plantas que resisten temperaturas subóptimas tienen la capacidad de mantener su metabolismo, obteniendo como resultado pequeñas o nulas disminuciones en el crecimiento y desarrollo respecto al potencial con temperatura óptima (Venema *et al.* 1999; Foolad y Lin 2001; Venema *et al.* 2005; Hund *et al.* 2008; Allinne *et al.* 2009; Liu *et al.* 2013).

En sorgo, tomate y arroz se ha observado que la sensibilidad a la baja temperatura durante la germinación y crecimiento de la planta son independientes (Alegre De La Soujeole y Miller 1984; Bertin *et al.* 1996; Foolad y Lin 2001). Además, Mock y McNeill (1979) en maíz y, Foolad y Lin (2000) en tomate determinaron que la resistencia a temperatura subóptima durante el crecimiento es independiente del vigor de la planta.

Se considera que en girasol pueden existir caracteres heredables que confieren capacidad para crecer y desarrollarse en condiciones de temperatura por debajo del óptimo. En maíz, tomate y arroz se han seleccionado genotipos con mayor tolerancia a temperaturas subóptimas, capaces de mantener un buen crecimiento, fotosíntesis y metabolismo celular bajo estrés térmico (Mock y McNeill 1979; Sthapit y Witcombe 1998; Foolad y Lin 2001; Pereira da Cruz *et al.* 2006). La resistencia a temperaturas subóptimas depende de la acción conjunta de numerosos mecanismos, regida principalmente por la herencia cuantitativa (Venema *et al.* 2005; Allinne *et al.* 2009). Durante la germinación y crecimiento de la plántula se ha observado que la heredabilidad ronda entre 0,59-0,90 según atributo y especie (Mock y McNeill 1979; Sthapit y Witcombe 1998; Pereira da Cruz *et al.* 2006). En girasol, se ha determinado herencia cuantitativa en la eficiencia fotosintética, el verdor de las hojas, el área específica y la fuga de electrolitos. Además, se observó que el área específica y fuga de electrolitos podrían estar asociados genéticamente (Allinne *et al.* 2009).

La performance durante la germinación, emergencia y primeros estadios vegetativos de una planta está gobernada por la expresión del genotipo y de los efectos maternos que afectan el desarrollo de la semilla. Estos efectos están modulados por las condiciones ambientales reinantes durante su formación, principalmente disponibilidad de agua, luz, nutrientes y sanidad (Wulff 1995).

En 2005, comenzó la exploración del germoplasma de girasol ruderal argentino por tolerancia a baja temperatura. En principio se encontraron diferencias significativas en el crecimiento y desarrollo bajo condiciones de 5/15°C (noche/día, fotoperíodo 12 h) durante el desarrollo inicial de la planta (Cantamutto *et al.* 2007 a). Luego de la selección de los mejores individuos ruderales y su multiplicación, se realizó el cruzamiento con líneas endocriadas. Al mismo tiempo se realizó la selección de los individuos con mejor performance a temperatura subóptima durante la etapa germinación-V2 (Schneiter y Miller 1981). Después de seis ciclos de selección se obtuvieron cinco poblaciones segregantes (PSel) promisorias para este carácter.

En función de lo expuesto, se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo y sus objetivos:

Hipótesis 1: Las PSEL generadas por selección muestran una mejora en la performance bajo temperatura subóptima para el girasol durante el período germinación-V2.

Hipótesis 2: Las PSEL expresan atributos específicos asociados al mayor desarrollo durante el período germinación-V2 bajo temperatura subóptima.

Objetivo 1: Evaluar el crecimiento y desarrollo de las PSEL bajo temperatura subóptima durante las etapas de germinación-V2.

Objetivo 2: Identificar atributos fisiológicos y/o morfológicos de las PSEL vinculados con la tolerancia a temperatura subóptima para el girasol durante las etapas de germinación-V2.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Se evaluaron tres grupos de materiales vegetales de origen genético diferente. Un grupo consistió de cinco poblaciones segregantes seleccionadas por mayor desarrollo a temperatura subóptima durante germinación-V2, generadas siguiendo el procedimiento indicado en la Figura 1.1, denominadas poblaciones seleccionadas (PSel). Como controles se utilizaron los otros dos grupos vegetales; uno constituido por cinco poblaciones ruderales argentinas de *H. annuus* (RUD), y el otro por dos híbridos de girasol (HIB) (Tabla 1.1).

Para la evaluación, la semilla se generó en el mismo ambiente materno (Wulff 1995), bajo polinización controlada durante la primavera-verano 2010/11 en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (CE-UNS; S38° 41' 38'' W 62° 14' 53''). La semilla se obtuvo en 3-5 capítulos de 20-30 plantas que fueron tapados en R4 con bolsas para exclusión de insectos y polinizados en forma controlada.

La regeneración de las PSel 6TF, 8TF y 10TF se realizó mediante autofecundación. Las poblaciones 9TF, 13TF y las RUD fueron regeneradas por cruzamientos entre individuos hermanos, debido a que son autoincompatibles (Presotto 2004). La semilla híbrida se obtuvo por polinización controlada de las líneas androestériles A10 y HA89 con las líneas restauradoras RHA432 y RHA274. La polinización controlada se realizó cada dos o tres días hasta que no se observaban más pistilos fértiles. La cosecha y la trilla de los capítulos se realizó luego de R9.

### **Condiciones experimentales**

#### **Experimento 1: Respuesta de la germinación a la temperatura**

Las semillas, almacenadas doce meses a temperatura ambiente, se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 20 segundos, y se enjuagaron con agua potable previamente hervida durante 10 minutos. Para inducir la germinación de semillas dormantes se realizó un pretratamiento de estratificación a 4-5°C sobre papel absorbente humedecido con agua destilada durante 7 días (ISTA 2004). Luego de ello se realizó un corte en la semilla en el extremo derecho opuesto a la radícula del embrión,

que abarcó 1/8 de la superficie de la misma, para disminuir el efecto de dormición producido por el pericarpio y la cubierta seminal, principales responsables de la inhibición de la germinación (Maiti *et al.* 2006; Brunick 2007; Vujaković *et al.* 2012; Presotto *et al.* 2014; Szemruch *et al.* 2014). Esta práctica se decidió después de verificar en un ensayo preliminar, que la dormición en las semillas de algunos de los materiales vegetales superaba el 50% solo con el pretratamiento de estratificación, datos no exhibidos.

Para evaluar la respuesta de la germinación a la temperatura, las semillas así acondicionadas se dispusieron sobre una placa de aluminio de un gradiente térmico (Hernández *et al.* 1995), modificada de acuerdo a lo descrito por Chatterton y Kadish (1969). Las temperaturas de evaluación, calibradas con un termómetro infrarrojo, fueron 5, 10, 15, 20 y 25°C. Las semillas se ubicaron en grupos de 8-12 sobre tres capas de papel absorbente, que se humedeció diariamente con agua destilada. Diariamente se escrutó la germinación. La semilla se consideraba germinada cuando la longitud de la radícula alcanzaba por lo menos la mitad del largo del fruto. Al finalizar el ensayo, a los 15 días, la viabilidad de las semillas no germinadas se determinó con la prueba de tetrazolio (TTC) (ISTA 2004). El diseño experimental fue en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones.

A partir de los datos obtenidos se determinó la viabilidad y dormición de las semillas de cada material vegetal, que se calculó en función de la ecuación 1 y 2, respectivamente:

$$SV (\%) = [(GA+VTTC)/TS]*100 \quad [1]$$

Siendo SV: total semillas vivas; GA: germinación total acumulada; VTTC: semillas no germinadas pero viables, determinadas con TTC; TS: total semillas.

$$DOR (\%)=[(VTTC)/TS]*100 \quad [2]$$

Siendo DOR: semillas dormantes; VTTC: semillas no germinadas pero viables, determinadas con TTC; TS: total semillas.

La tasa de germinación (TG) se calculó según la ecuación 3:

$$TG (\text{día}^{-1}) = 1/DG \quad [3]$$

siendo DG: días transcurridos desde la siembra hasta la germinación, determinada individualmente en cada semilla.

La germinación total acumulada (GA) se estimó en función de la ecuación 4:

$$GA (\%) = (GT/SV)*100 \quad [4]$$

siendo GA: germinación total acumulada; GT: total semillas germinadas al día 15; SV: total semillas vivas.

Se calculó el tiempo medio de germinación (TMG) a 10 y 15°C (tiempo necesario para que se produzca la germinación del 50% de las semillas viables). El TMG se calculó mediante la modelización de la respuesta de la germinación a través del tiempo, utilizando el paquete de datos Drc (Analysis of dose-response curve data) a través de la función logística de tres parámetros (Knezevic *et al.* 2007), definida en la ecuación 5:

$$TMG (\text{días}) = d / (1 + \exp(b(\log x - \log e))) \quad [5]$$

Siendo e: días desde la siembra en que se alcanza el 50% de la germinación, (tiempo medio de germinación). d: es el límite superior (germinación máxima). b: pendiente relativa alrededor de e.

La temperatura base de germinación (Tb) en cada grupo vegetal se determinó mediante regresión lineal entre la tasa diaria y la temperatura de germinación.

## **Experimento 2: Desarrollo temprano bajo temperatura subóptima**

Antes de la cría en una cámara de crecimiento, cada semilla se pesó individualmente, y se realizó el acondicionamiento descrito previamente (Experimento 1). La crianza se realizó bajo dos regímenes térmicos. El régimen de temperatura subóptimo (Tso) con alternancia térmica de 15/5°C, día/oscuridad, fotoperíodo neutro, y el régimen de temperatura óptimo (To), tratamiento control, con alternancia de 25/15°C día/oscuridad, fotoperíodo neutro.

Las semillas preacondicionadas fueron colocadas sobre papel de filtro humedecido en cajas de petri en la cámara de crecimiento. Diariamente las semillas que elongaron la radícula al menos la mitad del largo del fruto, se trasplantaron a bandejas multiceldas (70 cc) rellenas con sustrato MULTIPRO® de Terrafertil, compuesto por turba de musgo Sphagnum de fibra media y fina, vermiculita, cal calcita, cal dolomita, agentes humectantes y fertilizante. Las semillas germinadas se dispusieron dentro del sustrato con la radícula hacia abajo, dejando los cotiledones o el domo del pericarpio inmediatamente debajo del mismo. Las bandejas multiceldas estaban sumergidas un centímetro en agua potable para que las plantas estuviesen bien provistas de agua.

Grupos de 30 individuos fueron criados en la cámara de crecimiento hasta cuatro semanas después de la aparición del primer par de hojas (largo foliar mayor a 3 mm en las PSeI y RUD, y mayor a 5 mm en los HIB).

Se contabilizó diariamente la emergencia (E), considerada como tal cuando el grado de desarrollo era de 5 (cotiledones separados 45° uno del otro) según Tabla 1.2, o más; y la fecha en que se observaba la aparición del segundo par de hojas (2H) con un largo foliar mayor a 2 o 5 mm según grupo de pertenencia del material vegetal. A partir de estos datos se calcularon los días transcurridos desde la siembra hasta E (DS-E), desde E hasta 2H (DE-2H) y desde la siembra hasta 2H (DS-2H).

El desarrollo individual (DES) se midió según la escala de la Tabla 1.2, 15 días después de la E, y 15 días después de que el 50% de las plántulas de cada material vegetal alcanzaran la etapa E (DES-50E) y a la finalización del ensayo (DESF), cuatro semanas después de observada la aparición del primer par de hojas.

A partir de la aparición del primer par de hojas, dos veces por semana durante cuatro semanas se determinó la altura del vástago, altura del ápice caulinar desde de la superficie del sustrato, y el largo y ancho de una hoja del primer par. Se calculó el crecimiento relativo promedio del vástago (CRV) y de la superficie foliar (CRF), según la ecuación 6, y la superficie foliar (SUF) (con la fórmula de un triángulo rectángulo).

$$\text{CRV (cm cm}^{-1} \text{ día}^{-1}) \text{ o CRF (mm}^2 \text{ mm}^{-2} \text{ día}^{-1}) = [\sum((A_i - A_f)/D * A_i)]/8 \quad [6]$$

Siendo  $A_i$ : superficie/altura inicial;  $A_f$ : superficie/altura final; D: días transcurridos entre mediciones consecutivas.

Al finalizar el ensayo, se determinó la biomasa (BV) y longitud del vástago (LV), y la biomasa (BR) y longitud del sistema radicular (LR) en 15 plantas elegidas al azar. Las raíces fueron separadas del vástago y luego del sustrato mediante un suave lavado manual con agua. Las partes fueron secadas a estufa (65-70°C) hasta peso constante. Con la información obtenida se calculó la biomasa total (BT) como la suma de la BV y la BR, y la relación BV/BR.

En otro grupo de 15 plantas se determinó el verdor (VF) y el área específica (AES) en una hoja del primer par. El VF se estableció con un SPAD-Minolta-502. El AES (ecuación 7) se determinó en función de 2-5 discos de hoja de 0,39 cm<sup>2</sup> cortados con sacabocado y pesados luego de dos días de secado a estufa a 65-70°C.

$$\text{AES (cm}^2 \text{ g}^{-1}\text{)} = (\text{núm. discos} \times 0,39 \text{ cm}^2) / \text{peso seco de los discos} \quad [7]$$

En la otra hoja se determinó la fuga relativa de electrolitos (REL). Para calcular la REL (ecuación 8), la hoja sin pecíolo fue lavada tres veces y sumergida en agua destilada, inmediatamente luego de haber sido escindida. Después de permanecer por 24 horas en oscuridad a 4-5°C, se midió la conductividad eléctrica inicial ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) de la solución. Posteriormente el sistema fue colocado por dos horas a 90°C y se determinó la conductividad eléctrica final. En ambas ocasiones las mediciones se realizaron con la solución a temperatura ambiente. El conductímetro utilizado fue ORION 5 STAR de Thermo Electron Corporation.

$$\text{REL (\%)} = (\text{CEi}/\text{CEf}) * 100 \quad [8]$$

Siendo REL: fuga relativa de electrolitos; CEi: conductividad eléctrica inicial; CEf: conductividad eléctrica final.

### **Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat (actualización 2013) y la plataforma estadística R (versión 3.0.2).

Mediante la representación gráfica de los residuales en el QQ-plot, obtenidos al realizar el análisis de la varianza (ANOVA), se determinó la normalidad de los datos. Las variables que no presentaban esta condición fueron transformadas antes de su análisis. La disimilitud de los materiales vegetales evaluados produjo que las varianzas fueran

heterocedásticas, por ello el ANOVA se realizó con la aplicación de Modelos Lineales Mixtos de InfoStat, que implementa una interface amigable de la plataforma estadística R (Di Rienzo *et al.* 2012), que permitió tener en cuenta esta situación. Las medias fueron comparadas con el test LSD de Fisher. También se utilizó el test de Student para comparar las respuestas entre regímenes térmicos.

Aquellas variables cuya falta de normalidad no se pudo corregir mediante la transformación de los datos fueron analizadas mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

El análisis de componentes principales se realizó con el promedio de los datos recopilados de los caracteres biológicos evaluados en cada material vegetal. Las variables representadas fueron elegidas de manera que la varianza total reproducida fuera máxima.

**Tabla 1.1:** Caracteres fenotípicos y reproductivos del material vegetal evaluado.

Tipo de ramificación: Vástago sin ramificación (SR), con ramificación basal (RB), con ramificación apical (RA), con ramificación total (RT). sib: fecundación fraternal. ⊗: autofecundación.

Material vegetal	Origen geográfico y genético	Biomasa seminal <sup>2</sup> (mg)	Altura de la planta (cm)	Capítulo principal (%)	Capítulos planta <sup>-1</sup>	Tipo de ramificación (RS/RB/RA/RT, %)	Modalidad de polinización/ rasgos de interés agronómico
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i> argentino</b>							
<b>AAL</b>	Adolfo Alsina, Buenos Aires.	1,1	227 <sup>4</sup>	--	124 <sup>4</sup>	(0/0/0/100) <sup>5</sup>	sib
<b>BAR</b>	Colonia Barón, La Pampa.	0,8	205 <sup>4</sup>	--	122 <sup>4</sup>	(0/0/0/100) <sup>5</sup>	sib
<b>DIA</b>	Diamante, Entre Ríos.	1,0	195 <sup>4</sup>	--	105 <sup>4</sup>	(0/0/0/100) <sup>5</sup>	sib
<b>LMA</b>	Las Malvinas, Mendoza.	2,4	286 <sup>4</sup>	--	147 <sup>4</sup>	(0/0/0/100) <sup>5</sup>	sib
<b>RIV</b>	Rio Cuarto, Córdoba.	0,9	266 <sup>4</sup>	--	102 <sup>4</sup>	(0/0/0/100) <sup>5</sup>	sib
<b>Poblaciones seleccionadas (Genealogía en Figura 1)</b>							
<b>6TF</b>	((6TF⊗)⊗)⊗	3,5	104 <sup>2</sup>	100 <sup>2</sup>	9 <sup>2</sup>	(0/12/50/38) <sup>2</sup>	⊗
<b>8TF</b>	((8TF⊗)⊗)⊗	3,7	141 <sup>2</sup>	100 <sup>2</sup>	18 <sup>2</sup>	(0/0/29/71) <sup>2</sup>	⊗
<b>9TF</b>	((9TFsib)sib)sib	1,5	214 <sup>2</sup>	100 <sup>2</sup>	26 <sup>2</sup>	(0/0/29/71) <sup>2</sup>	sib/susceptibilidad a micoplasma
<b>10TF</b>	((10TF⊗)⊗)⊗	2,6	115 <sup>2</sup>	100 <sup>2</sup>	8 <sup>2</sup>	(0/83/0/17) <sup>2</sup>	⊗
<b>13TF</b>	((13TFsib)sib)sib	1,6	201 <sup>2</sup>	100 <sup>2</sup>	49 <sup>2</sup>	(0/0/29/71) <sup>2</sup>	sib
<b>Híbridos de girasol</b>							
<b>A10xRHA432</b>	A10 (línea endocriada ♀, androesteril); RHA432 (♂, restaurador de la fertilidad)	3,3	--	--	--	--	----- -----
<b>HA89xRHA274</b>	HA89 (línea endocriada ♀, androesteril), RHA274 (♂, restaurador de la fertilidad).	3,5	--	--	--	--	----- -----

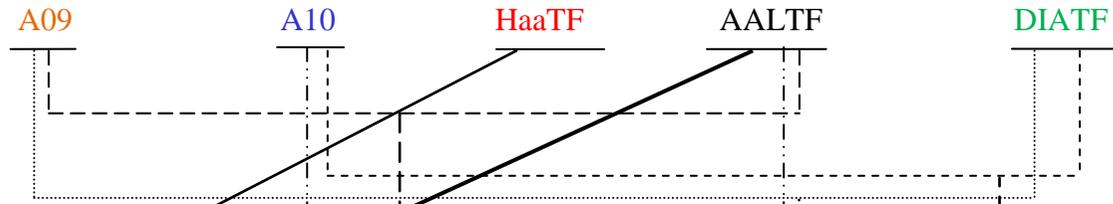
<sup>2</sup>Datos propios 2010/11. <sup>3</sup>Poverene *et al.* 2002. <sup>4</sup>Presotto 2007. <sup>5</sup>Presotto 2004.

**Figura 1.1:** Genealogía de las poblaciones segregantes seleccionadas por mayor desarrollo a temperatura subóptima durante germinación-V2.

**Estación de crecimiento**

**Recurso genético interviniente**

**2005/06**



**2006/07**

(HaaTF)sib; (AALTF)sib; A09x AALTF; A10x AALTF; A09x DIATF; A10x DIATF

**2007/08**

((HaaTF)sibx(AALTF)sib); ((AALTF)sibx(HaaTF)sib); (A09x AALTF)sib; (A10x AALTF)sib; (A09x DIATF)sib; ((A10x DIATF)x(HaaTF)sib); (A10x DIATF)sib

Derecha parental femenino, izquierda parental masculino.

**HaaTF:** individuos fenotípicamente similares al biotipo ruderal de *H. annuus* argentino, nacidos en el campo experimental del CE-UNS durante el inicio de la primavera

**AALTF:** individuos de la población Adolfo Alsina seleccionados por tolerancia a temperatura subóptima durante germinación-V2.

**DIATF:** individuos de la población Diamante seleccionados por tolerancia a temperatura subóptima durante germinación-V2.

**A09** y **A10:** líneas puras desarrolladas por el INTA-Manfredi (González *et al.* 2014).

sib: fecundación fraternal; ⊗: autofecundación.

Los individuos parentales que dieron origen a las poblaciones segregantes que tuvieron el o los mismos recursos genéticos pueden no haber sido los mismos.

**Figura 1.1:** Continuación**2007/08**

**((HaaTF)sibx(AALTF)sib); ((AALTF)sibx(HaaTF)sib); (A09xAALTF)sib; (A10xAALTF)sib; (A09xDIATF)sib; ((A10xDIATF)x(HaaTF)sib); (A10xDIATF)sib**

**2008/09****6TF: ((A10xDIATF)sib)sib****8TF: (((A09xAALTF)sib)x((A10xDIATF)x(HaaTF)sib))****9TF: ((AALTF)sibx(HaaTF)sib)sib****10TF: ((A10xAALTF)sib)x((A10xDIATF)x(HaaTF)sib)****13TF: ((HaaTF)sibx(AALTF)sib)sib****2009/2010****6TF⊗ ; 8TF⊗; 9TFsib; 10TF⊗; 13TFsib****2010/2011****(6TF⊗)⊗; (8TF⊗)⊗; (9TFsib)sib; (10TF⊗)⊗; (13TFsib)sib****Conformación genealógica resumida del PSel****((6TF⊗)⊗)⊗; ((8TF⊗)⊗)⊗; ((9TFsib)sib)sib; ((10TF⊗)⊗)⊗; ((13TFsib)sib)sib**

**Tabla 1.2:** Escala utilizada para la evaluación del crecimiento y desarrollo.

<b>Valor</b>	<b>Estado de desarrollo</b>
1	Gancho hipocotiledonal afuera del sustrato, doblado
2	Cotiledón 50% afuera sustrato
3	Cotiledón 100% afuera sustrato
4	Cotiledones pegados
5	Cotiledones a 45° uno del otro
6	Cotiledones separados más de 45° uno del otro
7	Cotiledones en un plano
8	Primer par de hojas verdaderas con largo menor al ancho de los cotiledones
9	Primer par de hojas verdaderas con largo similar al ancho de los cotiledones
10	Primer par de hojas verdaderas con largo mayor al ancho de los cotiledones pero menor que el doble del ancho
11	Primer par de hojas verdaderas con largo mayor al doble del ancho de los cotiledones
12	Segundo par de hojas verdaderas con largo menor al ancho de los cotiledones
13	Segundo par de hojas verdaderas con largo similar al ancho de los cotiledones
14	Segundo par de hojas verdaderas con largo mayor al ancho de los cotiledones pero menor que el doble del ancho
15	Segundo par de hojas verdaderas con largo mayor al doble del ancho de los cotiledones
16	Tercer par de hojas verdaderas con largo menor al ancho de los cotiledones
17	Cuarto par de hojas verdaderas con largo menor al ancho de los cotiledones
18	Quinto par de hojas verdaderas con largo menor al ancho de los cotiledones

## RESULTADOS

### Respuesta de la germinación a la temperatura

#### Viabilidad y dormición

La viabilidad de semilla alcanzó un valor mínimo de 80% en las RUD. En ellas y en la selección 13TF se observaron semillas dormantes. Las restantes PSel y los cultivares híbridos no presentaron esta condición fisiológica (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3:** Viabilidad y dormición (media, máximo y mínimo) de semillas de poblaciones seleccionadas (PSel), ruderales (RUD) y dos híbridos de girasol (HIB).

Material vegetal	Porcentaje (%)	
	Viables	Dormantes
	Media (máx., mín.)	Media (máx., mín.)
<b>PSel</b>		
6TF	98 (100, 88)	0 (0, 0)
8TF	100 (100, 100)	0 (0, 0)
9TF	98 (100, 90)	0 (0, 0)
10TF	98 (100, 90)	0 (0, 0)
13TF	98 (100, 90)	5 (30, 0)
<b>RUD</b>	96 (100, 80)	8 (38, 0)
<b>HIB</b>	99 (100, 88)	0 (0, 0)

#### Germinación

La germinación total acumulada presentó diferencias altamente significativas, entre material vegetal y temperaturas de germinación (Tabla 1.4). No se encontró interacción entre ambas fuentes de variación. En general, la germinación total fue máxima a 20°C y 25°C en todos los materiales vegetales evaluados (Tabla 1.5).

Las RUD RIV y LMA, el híbrido HA89xRH274 y la PSel 6TF presentaron una reducción significativa de la germinación cuando la temperatura fue igual o menor a 10°C. Fueron los materiales vegetales con mayor sensibilidad a la disminución de la temperatura durante la germinación. En cambio, la germinación total de las PSel 8TF, 9TF y 13TF disminuyó significativamente solo cuando la temperatura bajo a 5°C. En la PSel 10TF, la germinación total no fue afectada significativamente por la temperatura, y

estuvo por encima del 80% a 5°C. A esta temperatura la germinación total de 10TF superó a los HIB y a las RUD en más de 30% (Tabla 1.5).

A 5°C (Figura 1.2) la Psel 8TF adelantó la germinación, mientras que la Psel 10TF alcanzó el mayor valor de germinación acumulada. A 20 y 25°C, estas dos Psel mostraron una dinámica de germinación no diferente a los HIB, diferenciándose de los restantes materiales vegetales que retrasaron el inicio de la germinación a ese rango de temperatura.

La tasa diaria de germinación (Figura 1.3) aumentó a medida que la temperatura de germinación se incrementó. En su conjunto las Psel a 10°C mostraron mayor tasa de germinación que los HIB, mientras que no difirieron a 5 y 15°C. Por su parte las RUD presentaron menor tasa de germinación en todas las temperaturas evaluadas. A 20 y 25°C la tasa de germinación de los HIB superó a la de los restantes grupos vegetales.



**Tabla 1.4:** Análisis de la varianza de la germinación total acumulada a 5, 10, 15, 20 y 25°C, de poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol.

Fuente de variación	CM	F	p-valor
<b>Modelo</b>	0,35	7,0	**
<b>Material vegetal (MV)</b>	0,30	5,5	**
<b>Temperatura (T)</b>	3,76	76,0	**
<b>MV*T</b>	0,05	1,0	ns
<b>Bloque</b>	0,53	10,8	**
<b>Error</b>	0,05		

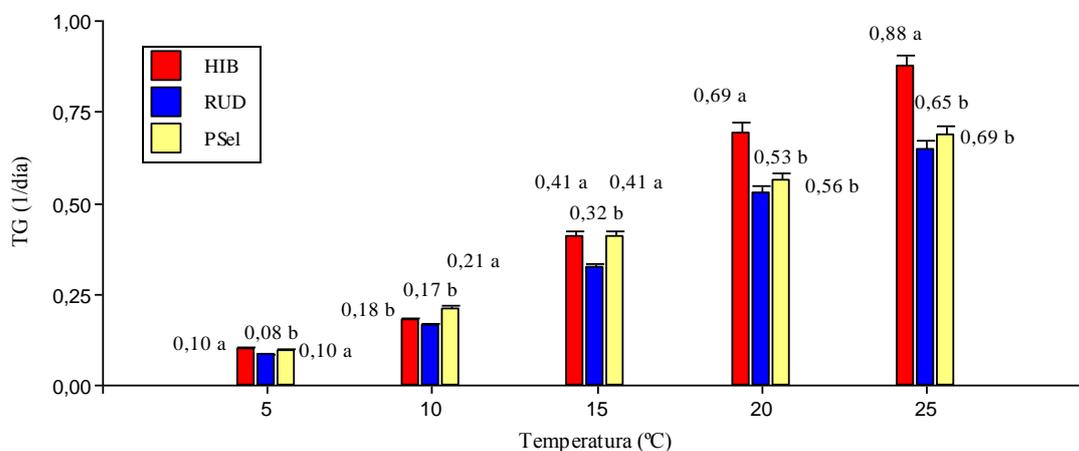
ANOVA: con datos transformados por  $\arcseno\sqrt{p}$ . P-valor:  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*), sin diferencias estadísticas  $p > 0,05$ (ns)

**Tabla 1.5:** Efecto de la temperatura constante sobre la germinación acumulada (media  $\pm$  error estándar) de las poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol.

Temperatura (°C)	Germinación total acumulada (%)											
	Poblaciones seleccionadas					Poblaciones ruderales					Híbridos de girasol	
	6TF	8TF	9TF	10TF	13TF	AAL	BAR	DIA	LMA	RIV	A10xRH432	HA89xRH274
<b>5</b>	61,0 $\pm$ 3,2 b	60,0 $\pm$ 15,2 b	60,0 $\pm$ 11,5 b	83,3 $\pm$ 12,0	20,7 $\pm$ 6,5 b	56,7 $\pm$ 3,3 b	18,0 $\pm$ 4,0 b	10,0 $\pm$ 10,0 b	39,7 $\pm$ 10,5 c	37,8 $\pm$ 13,2 c	56,7 $\pm$ 16,7 b	36,7 $\pm$ 17,6 b
<b>10</b>	76,7 $\pm$ 14,5 b	96,7 $\pm$ 3,3 a	96,3 $\pm$ 3,7 a	93,3 $\pm$ 3,4	89,7 $\pm$ 5,8 a	96,7 $\pm$ 3,3 a	86,0 $\pm$ 8,7 a	63,0 $\pm$ 16,3 a	75,3 $\pm$ 10,1 b	71,7 $\pm$ 21,3 b	96,7 $\pm$ 5,8 a	65,0 $\pm$ 17,6 b
<b>15</b>	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	92,7 $\pm$ 7,3 a	98,5 $\pm$ 4,0	87,7 $\pm$ 12,3 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	89,7 $\pm$ 5,8 a	85,3 $\pm$ 14,7 a	90,0 $\pm$ 10,0 ab	81,0 $\pm$ 19,0 ab	100,0 $\pm$ 0,0 a	96,7 $\pm$ 3,3 a
<b>20</b>	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0 a	94,3 $\pm$ 5,7 a	85,7 $\pm$ 9,8 a	90,3 $\pm$ 5,8 a	93,3 $\pm$ 6,7 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a
<b>25</b>	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0	90,0 $\pm$ 10,0 a	96,3 $\pm$ 3,7 a	85,0 $\pm$ 7,6 a	87,7 $\pm$ 12,3 a	93,3 $\pm$ 6,7 a	87,7 $\pm$ 12,3 ab	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a
ANOVA	**	**	*	ns	**	**	*	**	**	**	**	**

ANOVA: datos transformados por  $\arcseno\sqrt{p}$ . P-valor:  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*), sin diferencias estadísticas  $p > 0,05$ (ns). Letras diferentes indican diferencias estadísticas,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.

**Figura 1.3:** Efecto de la temperatura sobre la tasa diaria de germinación (TG) de las poblaciones seleccionadas (PSel), ruderales (RUD) y los híbridos de girasol (HIB).



ANOVA: se utilizó Modelos Lineales Mixtos., se aplicó el modelo varIdent para corregir la falta de homogeneidad de las varianzas de los materiales vegetales. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre materiales vegetales en cada temperatura,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.

El ajuste por ecuación logística, que fue significativo (Tabla 1.6), mostró que a 10°C la PSel 8TF alcanzó el 50% de la germinación al menos un día antes que los HIB. Las PSel 9TF y 6TF también se adelantaron al menos un día respecto a las RUD, mientras que la selecta 8TF las superó en dos días (Tabla 1.7).

Al aumentar la temperatura a 15°C, todos los materiales vegetales evaluados disminuyeron a la mitad el tiempo medio de germinación con respecto a 10°C (Tabla 1.7). A esta temperatura, la PSel 8TF también adelantó el tiempo medio de germinación con respecto a los HIB, aunque sin diferencias estadísticas. En cambio en las restantes PSel, el tiempo medio de germinación fue igual o superior al de los HIB. Las selecciones 8TF, 9TF y 10TF anticiparon significativamente su germinación en relación a las RUD.

**Tabla 1.6:** Parámetros de la curva logística de la dinámica de la germinación de poblaciones segregantes (PSel), ruderales (RUD) y los híbridos de girasol (HIB) a 10 y 15°C de temperatura.

Material vegetal	Parámetros de la curva y p-valor					
	10°C			15°C		
	b	d	e	b	d	E
<b>PSel</b>						
6TF	-4,8*	73,3**	4,4**	-2,6**	92,6**	2,5**
8TF	-5,1**	93,9**	3,5**	-3,8**	97,3**	1,5**
9TF	-3,6**	93,5**	4,4**	-2,7**	94,5**	1,9**
10TF	-3,4**	93,9**	5,0**	-3,1**	94,6**	2,1**
13TF	-5,8**	89,9**	5,8**	-6,0**	87,6**	2,9**
<b>RUD</b>	-5,7**	77,7**	5,6**	-4,2**	89,4**	2,8**
<b>HIB</b>	-4,4**	81,3**	5,3**	-3,6**	96,1**	1,9**
ANOVA <sup>(1)</sup> -prueba de falta de ajuste						
Modelo	p-valor			p-valor		
	1,00			1,00		

Parámetros de la curva: e: tiempo medio de germinación (días), d: germinación máxima, b: pendiente relativa alrededor de e. Test de Student: p-valor:  $p < 0,01$ (\*\*) y  $p < 0,05$ (\*), sin diferencias estadísticas  $p > 0,05$ (ns). <sup>(1)</sup>ANOVA para probar el ajuste del modelo logístico de tres parámetros.

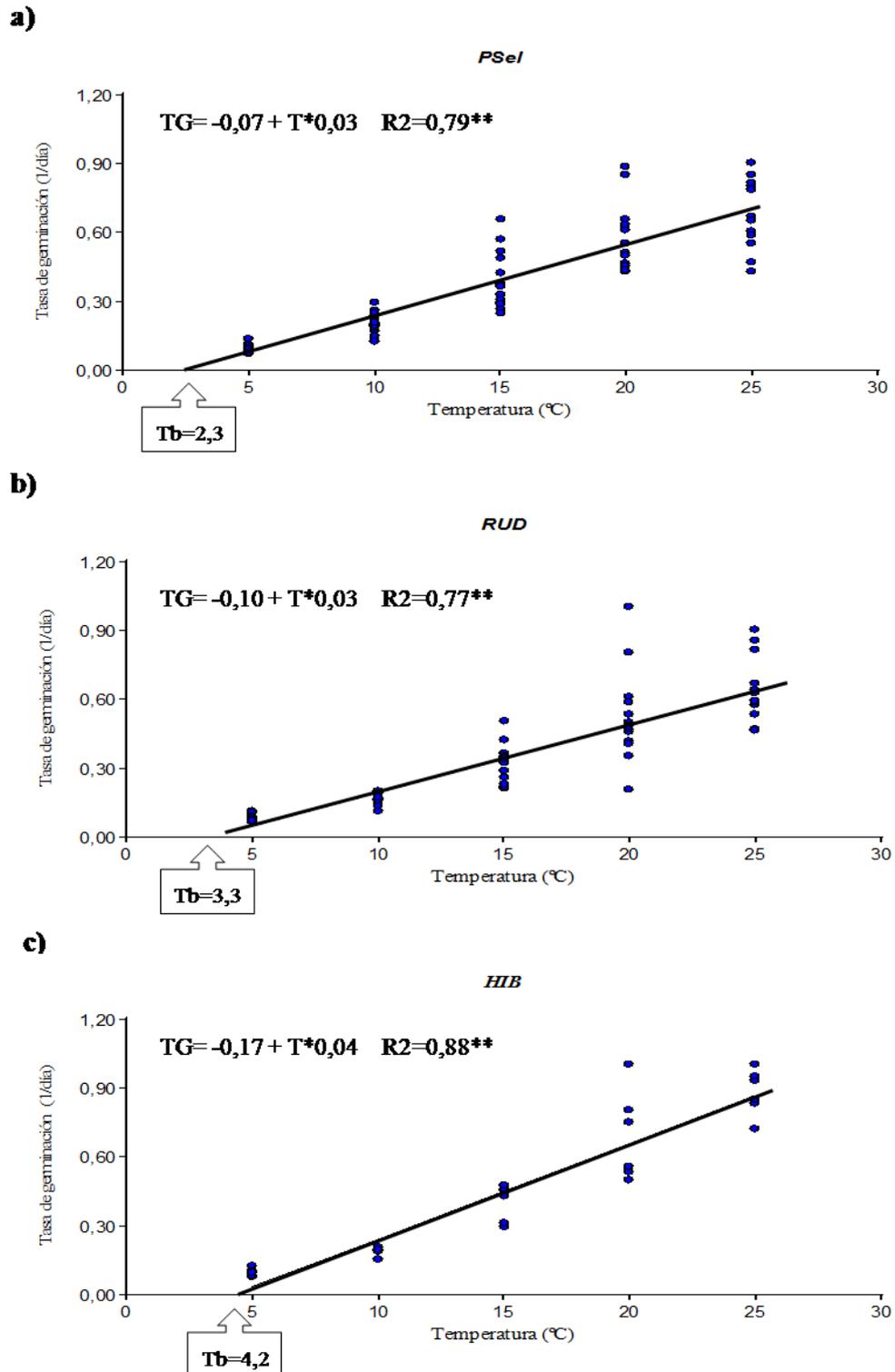
**Tabla 1.7:** Tiempo medio de germinación (TMG) a 10 y 15°C y diferencial ( $\Delta$ ) de poblaciones seleccionadas (PSel), ruderales (RUD) y dos híbridos de girasol (HIB) a 10°C y 15°C de temperatura.

PSel	Temperatura					
	10°C			15 °C		
	TMG	$\Delta$ HIB	$\Delta$ RUD	TMG	$\Delta$ HIB	$\Delta$ RUD
Días						
<b>6TF</b>	4,4	-0,9 ns	-1,2**	2,5	+0,6 ns	-0,3 ns
<b>8TF</b>	3,5	-1,8**	-2,1**	1,5	-0,4 ns	-1,3**
<b>9TF</b>	4,4	-0,9*	-1,2**	1,9	0,0 ns	-0,9**
<b>10TF</b>	5,0	-0,3 ns	-0,6 ns	2,1	+0,2 ns	-0,7**
<b>13TF</b>	5,8	+0,5 ns	+0,2 ns	2,9	+1,0**	+0,1 ns

En cada temperatura se muestran diferencias entre las medias de las Psel y los HIB o las RUD según test de Student para  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,05$  (\*), sin diferencias estadísticas  $p > 0,05$  (ns).

La regresión lineal (Figura 1.4) entre la tasa de germinación y la temperatura de germinación de los tres grupos vegetales mostró un  $R^2$  superior a 0,75. La temperatura base de las Psel fue de 2,3°C, mientras que la de los HIB y las RUD fue de 4,2°C y 3,3°C, respectivamente.

**Figura 1.4:** Regresión lineal entre la tasa diaria (TG) y la temperatura de germinación (T), y Tb de a) poblaciones seleccionadas (PSeI), b) poblaciones ruderales (RUD) y c) los híbridos de girasol (HIB).



### **Desarrollo temprano bajo temperatura subóptima**

En el régimen  $T_0$ , la emergencia de los materiales vegetales se produjo dentro de los primeros ocho días desde la siembra, pero ese período se extendió a más de dos semanas bajo la condición  $T_{so}$ . El lapso desde la emergencia hasta la aparición del segundo par de hojas también se extendió al bajar la temperatura de crecimiento, al igual que la duración total del período siembra-aparición del segundo par de hojas (Tabla 1.8).

Bajo condiciones térmicas óptimas y subóptimas, la duración del período siembra-emergencia de las Psel 6TF, 10TF y la RUD BAR fue similar al de los HIB cuya emergencia fue la más temprana en las dos condiciones térmicas (Tabla 1.8).

En la situación térmica favorable, el período emergencia-aparición del segundo par de hojas de la Psel 8TF fue menor al de los HIB (Tabla 1.8). En esta condición, las Psel 9TF, 10TF y la RUD LMA no difirieron del mejor híbrido. En el régimen  $T_{so}$ , la menor duración de este período, menor que la de los HIB, se observó en la Psel 10TF que no difirió estadísticamente de las Psel 8TF, 9TF, 13TF, ni de las RUD DIA y LMA.

La duración del período siembra-aparición del segundo par de hojas en la condición  $T_0$  fue mínima en el híbrido HA89xRH274, sin diferenciarse de la Psel 10TF (Tabla 1.8). Bajo condiciones subóptimas, 10TF y los HIB fueron los materiales vegetales que completaron esta atapa fenológica en el menor tiempo.

La temperatura afectó la tasa de desarrollo temprano de los materiales vegetales evaluados (Tabla 1.9). Bajo  $T_{so}$ , el desarrollo de las Psel 8TF, 9TF, 10TF y 13TF, medido 15 días después de la emergencia, fue estadísticamente similar a las RUD, al híbrido HA89xRH274, pero superó al híbrido A10xRH432. Bajo  $T_{so}$ , el desarrollo de 8TF, 9TF, 10TF y 13TF superó al de los híbridos 15 días después del 50% de emergencia. La diferencia en desarrollo radicó en la expansión foliar relativa al tamaño de los cotiledones (Tabla 1.2) alcanzada por cada grupo.

**Tabla 1.8:** Duración (días) de dos fases de desarrollo de las poblaciones seleccionadas, ruderales e híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso). Período siembra emergencia (DS-E), emergencia-aparición del segundo par de hojas (DE-2H) y el total del período (DS-2H).

Material vegetal	Duración del período (días)								
	DS-E			DE-2H			DS-2H		
	To	Tso	<i>t</i>	To	Tso	<i>t</i>	To	Tso	<i>t</i>
<b>Poblaciones seleccionadas</b>									
<b>6TF</b>	6,0 bc	19,7 de	**	10,3 bd	25,0 ab	**	16,4 cd	45,6 ab	**
<b>8TF</b>	6,5 ab	20,9 be	**	7,6 f	21,5 be	**	12,7 f	44,2 ab	**
<b>9TF</b>	6,8 ab	22,0 ad	**	10,0 be	20,1 ce	**	17,1 bd	42,9 b	**
<b>10TF</b>	6,2 bc	20,7 ce	**	9,3 de	19,1 e	**	15,6 de	40,4 c	**
<b>13TF</b>	5,9 bc	23,6 ac	**	10,6 b	21,3 ce	**	16,8 cd	44,7 ab	**
<b>Poblaciones ruderales</b>									
<b>AAL</b>	7,9 a	23,3 ac	**	12,4 a	24,3 ab	**	20,7 a	47,9 a	**
<b>BAR</b>	6,3 ac	18,7 de	**	13,6 a	26,3 a	**	20,7 a	45,6 ab	**
<b>DIA</b>	7,8 a	25,8 a	**	10,6 bc	19,1 de	**	18,7 ab	47,0 a	**
<b>LMA</b>	7,9 a	24,3 ab	**	9,6 ce	19,3 de	**	16,9 bc	45,1 ab	**
<b>RIV</b>	7,0 a	21,5 bd	**	11,1 b	22,2 bc	**	18,3 b	43,8 b	**
<b>Híbridos de girasol</b>									
<b>A10xRH432</b>	5,9 c	18,2 e	**	10,5 bc	21,7 bd	**	16,4 cd	39,6 c	**
<b>HA89xRH274</b>	5,7 c	17,8 e	**	9,2 e	22,0 bd	**	15,0 e	40,4 c	**
<b>ANOVA</b>	**	**		**	**		**	**	

ANOVA: se utilizó Modelos Lineales Mixtos, se aplicó el modelo varIdent para corregir la falta de homogeneidad de las varianzas de los materiales vegetales. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher. *t*: Prueba t para muestras independientes entre regímenes térmicos,  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*),  $p > 0,05$  (ns). Datos (x) transformados por  $\text{Ln}(x)$ .

Bajo Tso, el mayor desarrollo al final del ensayo se observó en la Psel 10TF, que no se diferenció de la RUD DIA y del híbrido A10xRH432 pero sí del resto de los materiales evaluados (Tabla 1.9).

Bajo To, la Psel 8TF tuvo un desarrollo superior al del resto de los materiales, excepto el híbrido HA89xRH274 que no se diferenció en el desarrollo al final del ensayo (Tabla 1.9).

**Tabla 1.9:** Desarrollo y crecimiento alcanzado por las poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol quince días luego de la emergencia (DES), quince días después del 50% de emergencia de la población (DES-50E) y al final del ensayo (DESF) bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).

Material vegetal	DES			DES-50E			DESF		
	To	Tso	t	To	Tso	t	To	Tso	t
<b>Poblaciones seleccionadas</b>									
6TF	11,9 c	8,4 cd	**	11,9 d	8,3 e	**	16,8 bc	12,4 cd	**
8TF	14,6 a	9,4 ab	**	15,1 a	10,3 a	**	17,2 a	13,1 bd	**
9TF	12,7 bc	9,4 ab	**	12,3 bd	10,3 a	**	16,8 bc	13,1 bd	**
10TF	13,6 ab	9,7 ab	**	13,6 b	9,7 ac	**	17,0 ab	14,5 a	**
13TF	11,5 d	9,2 ab	**	12,2 bd	9,8 ab	**	16,6 cd	13,0 bd	**
<b>Poblaciones ruderales</b>									
AAL	11,9 c	8,9 bc	**	11,7 d	8,8 ce	**	16,3 d	12,3 cd	**
BAR	11,4 d	8,7 bd	**	12,4 bd	8,8 ce	**	16,4 d	12,3 d	**
DIA	12,5 b	9,6 ab	**	12,0 cd	9,2 bc	**	16,7 bc	13,6 ac	**
LMA	13,0 ab	10,1 a	**	13,0 bc	10,0 a	**	16,5 cd	13,1 bd	**
RIV	12,4 bc	9,0 bc	**	12,4 bc	9,0 bd	**	16,7 bc	12,4 cd	**
<b>Híbridos de girasol</b>									
A10xRH432	12,5 bc	8,2 d	**	12,3 cd	8,5 de	**	16,8 bc	13,7 ab	**
HA89xRH274	12,5 bc	8,9 bc	**	12,4 cd	8,5 de	**	17,2 a	12,7 bd	**
Kruskal Wallis	**	**		**	**		**	**	

Kruskal Wallis: P-valor:  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*),  $p > 0,05$  (ns). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas para una misma columna,  $p < 0,05$ . t: Prueba t para muestras independientes entre regímenes térmicos,  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*),  $p > 0,05$  (ns).

En general, los HIB tuvieron mayor biomasa del vástago y radical que las RUD independientemente de la temperatura. La biomasa de las Psel fue intermedia entre los HIB y las RUD (Tabla 1.10).

El crecimiento con régimen Tso redujo significativamente la biomasa del vástago en todos los materiales vegetales salvo en A10xRH432. Contrariamente, la biomasa radical no fue afectada significativamente por la temperatura; con la excepción de la Psel 9TF cuya biomasa radical disminuyó bajo el régimen Tso (Tabla 1.10).

La relación entre la biomasa del vástago y la radical (Tabla 1.10) fue mayor bajo el régimen To; aunque en las PSEL, con excepción de 6TF, y en las RUD AAL y RIV la disminución de la biomasa del vástago en relación a la biomasa radicular bajo Tso no fue estadísticamente significativamente.

Cuando el crecimiento ocurrió bajo Tso, la longitud del vástago se redujo significativamente en todos los materiales evaluados, en promedio 36,5% (Tabla 1.11).

El largo de la raíz fue mayor en las PSEL e HIB que en las RUD bajo To. En cambio en Tso, estas diferencias desaparecieron. Bajo esta condición térmica, la raíz mantuvo su longitud en las PSEL 6TF, 10TF, 13TF, la RUD LMA y el híbrido HA89xRH274. En la PSEL 8TF, el largo de la raíz disminuyó significativamente (3 cm), mientras que la PSEL 9TF, las RUD AAL, BAR, DIA, RIV y el híbrido A10xRH432 mostraron un aumento significativo en el largo de la raíz, igual o superior a dos cm (Tabla 1.11).

**Tabla 1.10:** Biomasa (mg) del vástago (BV), radicular (BR) y relación BV/BR de plantas de girasol de poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).

Material vegetal	Biomasa (mg)						BV/BR		
	BV			BR			To	Tso	t
	To	Tso	t	To	Tso	t			
<b>Poblaciones seleccionadas</b>									
6TF	100,5 bc	60,9 cd	**	18,9 ab	17,8 b	ns	4,8 d	3,4 c	**
8TF	112,1 b	70,8 bc	**	19,9 ab	14,9 bc	ns	5,3 d	4,7 ab	ns
9TF	60,3 ef	37,7 ef	**	10,1 de	7,1 e	*	6,0 bd	5,4 ab	ns
10TF	70,8 de	50,4 de	*	10,7 ce	10,4 d	ns	6,6 ad	4,8 ab	ns
13TF	78,2 cd	47,9 ef	**	14,4 bc	11,0 cd	ns	5,4 cd	4,3ab	ns
<b>Poblaciones ruderales</b>									
AAL	49,4 fg	33,4 fg	*	8,8 e	6,0 e	ns	5,6 bd	5,5 a	ns
BAR	45,1 g	27,7 g	**	8,9 e	8,4 e	ns	5,0 d	3,3 c	**
DIA	54,6 eg	27,9 g	**	8,0 e	6,5 e	ns	6,8 c	4,3 ac	**
LMA	77,5 cd	47,9 ef	**	10,0 e	10,5 d	ns	7,8 a	4,7 ab	**
RIV	45,1 g	32,5 fg	*	7,2 e	6,3 e	ns	6,0 bd	5,1 a	ns
<b>Híbridos de girasol</b>									
A10xRH432	93,7 bc	83,1 ab	ns	13,2 cd	17,5 b	ns	7,1 ab	4,8 ab	**
HA89xRH274	159,1 a	98,5 a	**	24,0 a	25,3 a	ns	6,6 ac	3,9 bc	**
ANOVA	**	**	**	**	**	**	**	**	**

ANOVA: se utilizó Modelos Lineales Mixtos y aplicó el modelo varIdent para corregir la falta de homogeneidad de las varianzas de los materiales vegetales. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.  $t$ : Prueba  $t$  para muestras independientes entre regímenes térmicos,  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*),  $p > 0,05$  (ns). Datos (x) transformados por  $\ln(x)$ .

En general, la superficie foliar disminuyó cuando el desarrollo se produjo bajo Tso. Sin embargo, esta reducción no fue significativa en las Psel 9TF, 10TF, 13TF, las RUD BAR, DIA, LMA, RIV y el híbrido A10xRH432 (Tabla 1.12).

En el ambiente Tso, el verdor foliar aumentó respecto al ambiente control. Este incremento fue significativo en la Psel 6TF, 31,7%, las RUD AAL, BAR, DIA y RIV, entre 7-22%, y los HIB, 13-27% (Tabla 1.12).

La reducción de la temperatura de crecimiento disminuyó el área específica foliar 17,5%, promedio de los tres grupos vegetales. En la Psel 13TF y el híbrido A10xRH432 el detrimento del área específica no fue significativo. La RUD RIV y los HIB exhibieron valores altos de área específica en el ambiente con régimen térmico óptimo y subóptimo. En cambio, las Psel 10TF y 6TF solo presentaron valores altos bajo To (Tabla 1.12).

**Tabla 1.11:** Longitud (cm) del vástago (LV) y de la raíz (LR) de poblaciones seleccionadas, ruderales e híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).

Material vegetal	Longitud (cm)					
	LV			LR		
	To	Tso	<i>t</i>	To	Tso	<i>t</i>
<b>Poblaciones seleccionadas</b>						
<b>6TF</b>	16,0 e	8,8 e	**	16,1 ab	16,3 ab	ns
<b>8TF</b>	19,2 c	11,6 bc	**	17,1 a	13,9 bd	*
<b>9TF</b>	15,3 ef	12,4 b	**	12,4 ef	14,4 d	*
<b>10TF</b>	21,3 b	11,4 bc	**	14,5 bd	13,2 cd	ns
<b>13TF</b>	16,0 e	12,4 b	**	14,8 bd	16,2 ab	ns
<b>Poblaciones ruderales</b>						
<b>AAL</b>	16,6 de	11,8 bc	**	11,1 fg	13,5 cd	*
<b>BAR</b>	14,2 f	9,7 d	**	10,6 g	13,1 d	**
<b>DIA</b>	14,3 f	8,1 e	**	13,4 ce	16,9 a	**
<b>LMA</b>	18,1 cd	12,8 b	**	13,8 ce	14,1 bd	ns
<b>RIV</b>	15,9 ef	10,6 cd	**	11,1 fg	14,4 ab	*
<b>Híbridos de girasol</b>						
<b>A10xRH432</b>	26,7 a	15,3 a	**	13,2 de	15,4 ac	*
<b>HA89xRH274</b>	21,6 b	12,5 b	**	15,1 bc	16,1 ab	ns
<b>ANOVA</b>	**	**		**	**	

ANOVA: se utilizó Modelos Lineales Mixtos y aplicó el modelo varIdent para corregir la falta de homogeneidad de las varianzas de los materiales vegetales. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher. *t*: Prueba t para muestras independientes entre regímenes térmicos. P-valor:  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*),  $p > 0,05$  (ns). Datos (x) transformados por  $\sqrt{x}$ .

En promedio la fuga relativa de electrolitos, cuando el crecimiento de la planta se produjo a To, fue de 27,9%. El crecimiento en frío redujo la fuga de electrolitos más de cinco puntos porcentuales. En las PSel 8TF, 9TF, 13TF y la RUD AAL, la disminución observada no fue significativa. Bajo el ambiente Tso, la RUD DIA tuvo la menor fuga de electrolitos, 13,8% (Tabla 1.12).

El crecimiento relativo foliar bajo el régimen To fue similar en todos los materiales vegetales evaluados. Sin embargo a Tso, el híbrido HA89xRH274 tuvo el valor más alto, sin diferenciarse de la RUD LMA. Bajo Tso, las PSel 9TF, 10TF y la RUD DIA disminuyeron el crecimiento relativo foliar (Tabla 1.13).

En To y Tso, la PSel 10TF, las RUD BAR, DIA y RIV tuvieron la velocidad de crecimiento relativa del vástago más alta. El híbrido HA89xRH274 también presentó alto crecimiento relativo del vástago, aunque solo bajo Tso. Todos los materiales vegetales disminuyeron el crecimiento relativo del vástago bajo Tso, salvo la PSel 9TF (Tabla 1.13).

**Tabla 1.12:** Superficie (SUF), verdor (VF), área específica (AES) y fuga relativa de electrolitos (REL) foliar de poblaciones seleccionadas, ruderales y los híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).

Material vegetal	SUF (cm <sup>2</sup> )			VF (unidades SPAD)			AES (cm <sup>2</sup> /g)			REL (%)		
	To	Tso	t	To	Tso	t	To	Tso	t	To	Tso	t
<b>Poblaciones seleccionadas</b>												
<b>6TF</b>	4,4 b	2,6 c	**	25,2 e	33,2 a	**	702,1 ab	475,2 e	**	22,3 cd	15,2 d	**
<b>8TF</b>	3,8 b	2,2 cd	**	29,5 a	28,9 eg	ns	636,9 bc	535,4 d	**	21,3 d	16,6 ad	ns
<b>9TF</b>	1,8 ef	1,7 eg	ns	26,7 cd	27,7 gh	ns	667,3 bc	543,2 cd	**	23,8 bd	19,7 ad	ns
<b>10TF</b>	2,8 c	2,0 de	ns	26,8 cd	26,4 h	ns	687,6 ac	573,2 bd	*	30,0 a	19,7 ad	*
<b>13TF</b>	2,0 de	1,9 df	ns	29,4 a	28,6 fg	ns	617,4 c	566,5 bd	ns	22,1 cd	21,3 ab	ns
<b>Poblaciones ruderales</b>												
<b>AAL</b>	2,2 d	1,8 dg	**	27,0 bd	29,1 eg	*	641,4 bc	561,5 bd	*	25,6 ac	23,0 a	ns
<b>BAR</b>	1,6 fg	1,5 g	ns	27,5 bd	32,4 ab	**	660,1 bc	525,8 d	**	21,3 d	15,9 ad	**
<b>DIA</b>	1,9 de	1,6 fg	ns	25,2 de	30,6 cd	**	696,4 bc	533,8 d	**	23,0 cd	13,8 d	**
<b>LMA</b>	2,8 c	2,5 c	ns	28,7 ab	29,4 df	ns	666,4 bc	562,2 bd	*	22,1 cd	15,9 ad	**
<b>RIV</b>	1,4 g	1,5 fg	ns	24,4 e	29,3 bc	**	701,0 ac	590,7 ac	*	25,5 bd	15,9 ad	*
<b>Híbridos de girasol</b>												
<b>A10xRH432</b>	2,8 c	3,1 b	ns	26,7 cd	30,4 de	**	690,1 ac	615,8 ab	ns	28,2 ab	20,5 ac	*
<b>HA89xRH274</b>	7,6 a	6,0 a	**	25,2 e	31,9 bc	**	789,9 a	648,4 a	**	23,0 cd	15,9 bd	**
<b>ANOVA</b>	**	**		**	**					**	*	

ANOVA: se utilizó Modelos Lineales Mixtos y aplicó el modelo varIdent para corregir la falta de homogeneidad de las varianzas de los materiales vegetales. P-valor: p<0,01 (\*\*), p<0,05 (\*), sin diferencias estadísticas p>0,05(ns). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna, p<0,05 según test LSD Fisher. t: Prueba t para muestras independientes entre regímenes térmicos. P-valor: p<0,01 (\*\*), p<0,05 (\*), p>0,05 (ns). Se transformó la SUF por  $\sqrt{\text{SUF}}$  y REL por  $\arcseno\sqrt{(\text{REL}/100)}$ .

**Tabla 1.13:** Crecimiento relativo foliar y del vástago (media  $\pm$  error estandar) de poblaciones seleccionadas, ruderales y dos híbridos de girasol bajo régimen térmico óptimo (To) y subóptimo (Tso).

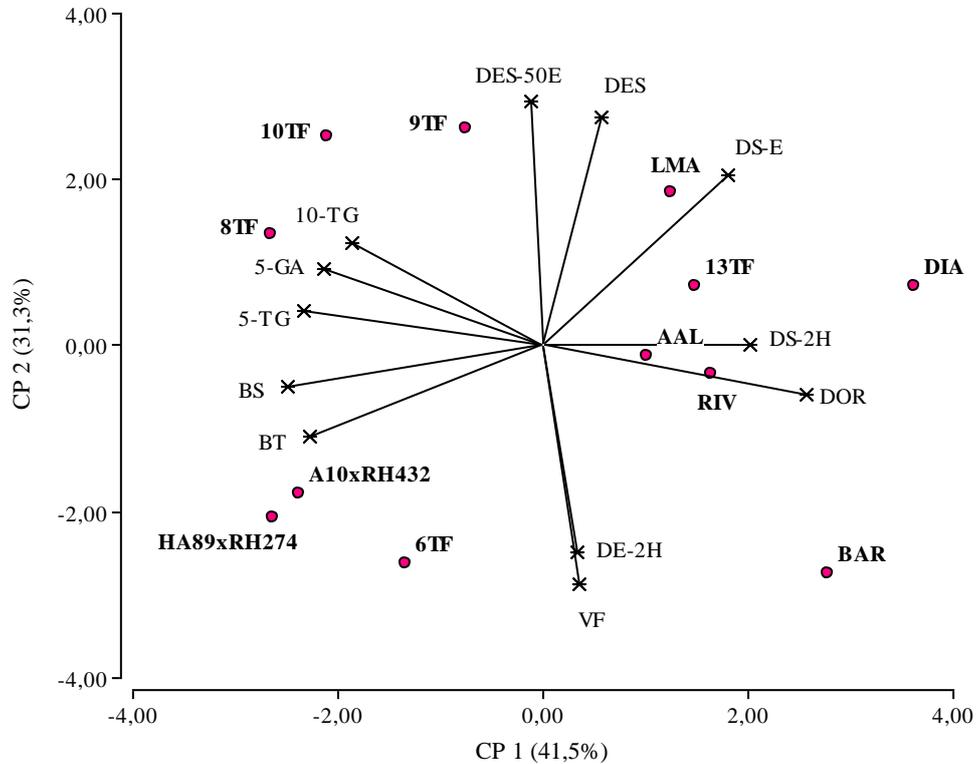
Material Vegetal	Crecimiento relativo					
	Foliar (cm <sup>2</sup> cm <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )			Vástago (cm cm <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )		
	To	Tso	<i>t</i>	To	Tso	<i>t</i>
<b>Poblaciones seleccionadas</b>						
6TF	0,29 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,01 b	ns	0,05 $\pm$ 0,01 bc	0,04 $\pm$ 0,01 bc	**
8TF	0,25 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,01 c	ns	0,06 $\pm$ 0,01 b	0,04 $\pm$ 0,01 bc	**
9TF	0,38 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,02 bc	*	0,05 $\pm$ 0,01 bd	0,04 $\pm$ 0,01 bc	ns
10TF	0,42 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,01 bc	**	0,07 $\pm$ 0,01 a	0,06 $\pm$ 0,01 a	**
13TF	0,24 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,02 b	ns	0,05 $\pm$ 0,01 cd	0,04 $\pm$ 0,01 c	*
<b>Poblaciones ruderales</b>						
AAL	0,28 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,02 b	ns	0,05 $\pm$ 0,01 bc	0,04 $\pm$ 0,01 cd	**
BAR	0,36 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,02 bc	ns	0,09 $\pm$ 0,01 a	0,05 $\pm$ 0,01 ab	**
DIA	0,32 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,02 bc	*	0,08 $\pm$ 0,01 a	0,06 $\pm$ 0,02 ac	**
LMA	0,29 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,03 ab	ns	0,05 $\pm$ 0,01 d	0,03 $\pm$ 0,01 d	**
RIV	0,27 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,01 b	ns	0,08 $\pm$ 0,01 a	0,05 $\pm$ 0,01 ab	**
<b>Híbridos de girasol</b>						
A10xRH432	0,34 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,01 b	ns	0,05 $\pm$ 0,01 b	0,04 $\pm$ 0,01 bc	**
HA89xRH274	0,57 $\pm$ 0,10	0,30 $\pm$ 0,01 a	ns	0,06 $\pm$ 0,01 b	0,05 $\pm$ 0,01 ab	*
ANOVA	ns	**		**	**	

ANOVA: se utilizó Modelos Lineales Mixtos y aplicó el modelo varIdent para corregir la falta de homogeneidad de las varianzas de los materiales vegetales. P-valor: p<0,01 (\*\*), p<0,05 (\*), sin diferencias estadísticas p>0,05(ns). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna, p<0,05 según test LSD Fisher. *t*: Prueba t para muestras independientes entre regímenes térmicos. P-valor: p<0,01 (\*\*), p<0,05 (\*), sin diferencias estadísticas p>0,05(ns). Datos (x) fueron transformados por Ln(x\*100).

La varianza explicada por las primeras dos componentes del análisis multivariado de componentes principales fue de 72,8% (Figura 1.5). La primera componente fue definida en sentido positivo principalmente por la duración de la etapa siembra-emergencia y siembra-aparición del segundo par de hojas, y la presencia de dormición en las semillas; y en sentido negativo por la tasa de germinación a 5°C y 10°C, la germinación acumulada a 5°C, la biomasa seminal y total de planta. La segunda componente fue definida por el desarrollo inicial de la planta, y en sentido opuesto por el verdor foliar y la duración del período emergencia-aparición del segundo par de hojas.

Se observó que las Psel 8TF y 10TF bajo Tso presentaron valores relativamente elevados de tasa de germinación, germinación acumulada, biomasa seminal y biomasa total de la planta, similar a lo observado en los HIB. Las Psel se diferenciaron de los HIB por presentar mayor desarrollo en el período emergencia aparición del segundo par de hojas. Por el contrario las RUD requirieron mayor tiempo para cumplir con las etapas iniciales del desarrollo y presentaron mayor proporción de semillas dormantes (Figura 1.5).

**Figura 1.5:** Análisis de componentes principales de poblaciones segregantes (6TF, 8TF, 9TF, 10TF y 13TF), poblaciones ruderales (AAL, BAR, DIA, LMA y RIV) y dos híbridos de girasol (A10xRH432 y HA89xRH274) evaluadas durante la germinación y el desarrollo de planta joven a temperaturas subóptimas.



Variables vectores: dormición (DOR), tasa de germinación a 5 y 10°C (5-TG, 10-TG), germinación acumulada 5°C (5-GA), biomasa seminal (BS), biomasa total (BT), duración (días, D) del período siembra-emergencia (S-E), emergencia-aparición del segundo par de hojas (E-2H) y siembra- aparición del segundo par de hojas (S-2H), grado de desarrollo evaluado 15 días después de la emergencia (DES), grado de desarrollo evaluado 15 días después de haberse producido el 50 % de la emergencia en cada material vegetal (DES-50E) y verdor foliar (VF).

## DISCUSIÓN

La viabilidad de los materiales vegetales evaluados fue mayor al 95% (Tabla 1.3), valor absoluto por encima del mínimo de 85% de germinación establecido por la legislación nacional para la comercialización de semillas de girasol (SAGPYA 1993). Se considera que viabilidad resulta un buen estimador de la capacidad potencial de germinación de semillas con dormición (ISTA 2004), como las RUD y algunas PSel (Tabla 1.3).

Las RUD y la selección 13TF presentaron semillas dormantes, a diferencia de las PSel 6TF, 8TF, 9TF y 10TF, y los híbridos, aún con la aplicación de un pretratamiento de estratificación y la remoción mecánica de una parte de su pericarpio y cubierta seminal (Tabla 1.3).

Las semillas de girasol poseen dormición; controlada por el embrión (Le Page Degivry *et al.* 1990, Le Page Degivry y Garello 1992; Bianco *et al.* 1994; Roselló *et al.* 2016), la cubierta seminal y el pericarpio (Szemruch *et al.* 2014; Andrade *et al.* 2015). El grado de participación de cada una de estas estructuras seminales y el grado de dormición depende del genotipo (Maiti *et al.* 2006; Brunick *et al.* 2007; Vujaković *et al.* 2012; Presotto *et al.* 2014) y de la interacción de este con el ambiente durante el período de desarrollo de la semilla en la planta madre (Mercer *et al.* 2006; Baskin y Baskin 2014).

En el girasol doméstico este estado es superado rápidamente, sin que sea necesario ningún tratamiento, aproximadamente dos meses después de la cosecha (Pallavi *et al.* 2010; Maiti *et al.* 2006; Bazin *et al.* 2011). En cambio, los biotipos silvestres pueden manifestar dormición por períodos mucho más prolongados (Snow *et al.* 1998; Seiler 1998; Presotto *et al.* 2014).

La dormición de la semillas de la PSel 13TF probablemente haya sido heredada de los parentales que conformaron su genealogía, constituidos por individuos de la RUD AAL e individuos fenotípicamente similares al biotipo ruderal *H. annuus* nacidos durante el inicio de la primavera en el CE-UNS (Figura 1.1). La PSel 9TF, con genealogía similar a 13TF, no presentó semillas dormantes luego de la estratificación y escarificación mecánica. Probablemente esta disimilitud entre estas PSel se debió a la variabilidad genética en el carácter de dormición que presentaban los individuos utilizados como parentales de cada PSel. El carácter de dormición en semillas de numerosas especies es un rasgo heredable (Baskin y Baskin 2014). Esto mismo sugieren numerosos estudios

entre girasol doméstico y silvestre (Mercer *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2013). Presotto *et al.* (2014) estudiaron la dormición de semillas de cinco poblaciones ruderales de *H. annuus* utilizadas en este trabajo; dos de las cuales, AAL y DIA, intervinieron directamente en la conformación de las PSEL. Ellos observaron variabilidad intra e inter poblacional en el grado de dormición de las semillas y en la importancia relativa del pericarpio en la superación de la misma. En las cinco poblaciones ruderales se observaron semillas con y sin dormición doce meses después de la madurez fisiológica. En algunas poblaciones las semillas dormantes superaban el 30% mientras que en otras era mínima, 3%. La escarificación mecánica aumentó la germinación más de un 60%, por encima de lo observado por aplicación exógena de giberelinas, un pretratamiento de estratificación a 5°C o la exposición a la luz.; pero los aumentos en la germinación fueron entre el 30% y el 70% dependiendo de la población ruderal evaluada.

El resto de las PSEL sin semillas dormantes contaron con el aporte del germoplasma de una línea endocriada, A09 o A10 (González *et al.* 2014) (Figura 1.1). En las formas modernas de girasol la menor dormición está asociada al proceso de domesticación, que favoreció a semillas de mayor tamaño, biomasa y al mismo tiempo menor dormición (Harlan 1975; Heiser 1978). Está comprobado que la semilla de compuestos híbridos entre biotipos silvestres y cultivados tiene menor grado de dormición que su parental silvestre (Mercer *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2013; Presotto *et al.* 2014).

En la mayoría de las poblaciones la germinación máxima acumulada se observó a 20 y 25°C. Cuando la temperatura de germinación descendió por debajo de los 20°C, se observó una disminución creciente de la germinación acumulada (Tabla 1.5). Hernández y Paoloni (1998), Khalifa *et al.* (2000) y Trápani *et al.* (2003) también observaron que la temperatura óptima de germinación del girasol se encuentra en el rango 20-25°C. La germinación acumulada a 5°C de las población selecta 13TF así como en las poblaciones ruderales BAR, DIA, LMA, RIV y el híbrido HA89xRH274 disminuyó por debajo de 40%. La selección 10TF, que mantuvo la germinación acumulada por encima del 80% a 5°C, se destacó por su tolerancia a la germinación a temperatura subóptima (Tabla 1.5). Escasos son los híbridos de girasol que a temperaturas menores de 10°C la germinación máxima alcanza valores superiores al 50% (Hernández y Paoloni 1998; Khalifa *et al.* 2000) en quince días.

La tasa diaria de germinación también se redujo en todos los materiales vegetales cuando la temperatura se encontró por debajo de 25°C (Figura 1.2). La tasa máxima de germinación reportada para el girasol se encuentra entre 15-35°C (Hernández y Paoloni 1998; Khalifa *et al.* 2000; Trápani *et al.* 2003; González Belo *et al.* 2014). A temperaturas subóptimas, una alta tasa de germinación permite que la emergencia se produzca rápidamente, disminuyendo la probabilidad de pérdida de plantas por insectos y patógenos del suelo, aumentando la uniformidad del cultivo (Raventos 1985; Fonseca 1987; Iriarte 2001; Pereyra *et al.* 2001; Díaz Zorita *et al.* 2003; Barrosa *et al.* 2004; González Montaner y Di Napoli 2004; González Montaner *et al.* 2010). Las poblaciones seleccionadas tuvieron mayor tasa de germinación a 10°C que los híbridos (Figura 1.2). Este rasgo proporcionaría una ventaja en siembras tempranas.

A 10°C, la selección 8TF se destacó por su menor tiempo medio de germinación, 3,5 días, adelantándose con respecto a los híbridos, 1,8 días, y a las RUD, 2,1 días; y a 15°C, 1,3 días respecto a las RUD (Tabla 1.7). Murcia *et al.* (2006), determinaron un período de 4,5-6,1 días como el tiempo promedio requerido para la germinación a 10°C de diez cultivares de girasol producidos por empresas semilleras en la zona norte de la provincia de Buenos Aires, Argentina; 1 día más que lo registrado en la selección 8TF.

A 5°C, la germinación de la selecta 8TF también comenzó rápidamente (Figura 1.2), aunque la germinación acumulada fue menor a la obtenida por la selección 10TF.

Las selecciones 8TF y 10TF, se destacaron en la germinación a temperatura subóptima, por tener menor tiempo medio de germinación o alcanzar el mayor valor de germinación acumulada, respectivamente, superando a los híbridos de girasol.

La temperatura base de germinación observada en los tres grupos vegetales, entre 2,3°C y 4,2°C, es menor a la observada por Connor y Hall (1997) o Trudgill *et al.* (2000). En girasol, una temperatura base de 2,3°C como la observada en las Psel, o menor fue reportada por González Belo *et al.* (2014) en algunos cultivares.

La emergencia, que en el régimen To sucedió entre 5-8 días desde la siembra, se retrasó 12-15 días bajo Tso (Tabla 1.8). Similar comportamiento ha sido observado en la emergencia a campo del girasol. Cuando la temperatura es óptima, con adecuada provisión de agua la emergencia sucede entre 6-9 días desde la siembra. A temperaturas subóptimas la emergencia se demora, ya que en esta etapa la temperatura del suelo es el

principal factor que determina la velocidad de los procesos biológicos. En siembras tempranas se ha observado emergencia a 19-21 días desde la siembra. Temperaturas del suelo menores a 10°C, demoran excesivamente esta etapa y puede haber pérdidas de plantas por patógenos o plagas, disminuyendo el stand óptimo (Raventos 1985; Fonseca 1987; Barrosa *et al.* 2004). En el régimen térmico Tso, las selecciones 6TF, 8TF y 10TF emergieron a los 20-21 días desde la siembra, sin diferenciarse estadísticamente de los híbridos (Tabla 1.8).

Bajo Tso, el desarrollo luego de la emergencia también se retrasó, demandando el doble de tiempo para alcanzar la misma etapa fenológica que bajo To. El retraso en el desarrollo a temperatura subóptima era esperable, ya que la tasa de aparición y expansión de hojas cuando no existen limitantes hídricas y nutricionales, está principalmente gobernada por la temperatura (Granier y Tardieu 1998; Andrade *et al.* 2000). Esta situación sucede en siembras tempranas de girasol, cuando la temperatura del suelo es inferior a 15°C (Pereyra *et al.* 2001). En este escenario, la emergencia y el desarrollo de la planta se atrasa, alargando el período vegetativo. Además, en general el área foliar final aumenta, en respuesta al aumento de la duración del período de expansión foliar (Rawson y Hindmarsh 1982). Ello puede aumentar el consumo de agua en etapas críticas y así perjudicar el rendimiento en estaciones secas (Andrade *et al.* 2000; Pereyra *et al.* 2001).

En el régimen térmico Tso, se destacó la selección 10TF que mostró mayor desarrollo desde la emergencia que los cultivares híbridos, anticipando por lo menos dos días la aparición del segundo par de hojas (Tabla 1.8). La selección 10TF también tuvo mayor desarrollo de la planta que los híbridos bajo este régimen térmico (Tabla 1.9). Esta selección mostró la mayor tasa de desarrollo a temperatura subóptima, rasgo que podría contribuir con el perfeccionamiento de líneas cultivadas para que el período vegetativo no se distienda excesivamente en siembras con temperaturas del suelo y atmosféricas inferiores a las óptimas.

Se remarca que la población selecta 10TF, junto con 6TF y 8TF, resultaron de un proceso de fuerte endocria durante tres generaciones (Figura 1.1), que en una especie alógama como el girasol generalmente causa depresión por consanguinidad (Cubero 2003). En forma contrapuesta, los controles A10xRH432 y HA89xRH274 fueron materiales genéticos promisorios, provenientes del cruzamiento de dos líneas

endocriadas lo que generalmente causa heterosis (vigor híbrido) en especies alógamas, expresándose en el híbrido como un alto potencial genético (Acquaah 2012).

En general, el régimen Tso afectó más el crecimiento de la parte aérea que la radical de las poblaciones seleccionadas (Tabla 1.10). Esta condición fue reflejada en la relación biomasa del vástago/biomasa radical, que bajo Tso redujo su valor (Tabla 1.11). En general, la temperatura óptima para el crecimiento radical resulta menor que la del vástago, por lo que la disminución de la temperatura de crecimiento afecta más la parte aérea que la radical. Durante la etapa vegetativa, cuando la temperatura de crecimiento es óptima, la biomasa radicular resulta proporcionalmente mínima respecto a la biomasa aérea. Esta situación fue la observada en el presente trabajo. Sin embargo, ello se contrapone con Murcia *et al.* (2006) quienes observaron que a 10°C, el peso seco radicular fue afectado más que el del vástago en plántulas de girasol de diez días. Posiblemente ello se debió a que en esta etapa ontogénica el desarrollo ocurre casi con exclusividad a expensas de las reservas de la semilla, que se encuentran alojadas en los cotiledones, componentes de la parte aérea en esta especie de germinación epígea (Hanley *et al.* 2004). En plántulas de soja se observó que las poblaciones tolerantes a temperaturas subóptimas poseían mayor desarrollo y peso fresco que las sensibles a baja temperatura, aunque el peso seco no variaba entre las mismas, siendo similar al peso seminal (Littlejohns y Tanner 1976). Las plántulas observadas por Murcia *et al.* (2006) presentaron escaso desarrollo, y posiblemente la mayoría de las reservas todavía estaban sin utilizar. Esta situación podría explicar los resultados discordantes con el presente trabajo.

Bajo el régimen térmico Tso se destacó la selección 10TF que se posicionó después del híbrido con mejor performance, A10xRH432, que tuvo mínima reducción de la biomasa del vástago, menor a 10%, y aumentó más del 30% la biomasa radicular. Por el contrario la selección 9TF fue la más sensible ya que la reducción de la biomasa del vástago y radicular fue mayor al 27%.

En Tso, la superficie foliar de las selecciones 9TF, 10TF, 13TF no cambió al igual que BAR, DIA, LMA, RIV y A10xRH432. En general el verdor de las hojas aumentó a Tso (Tabla 1.12). En especies sensibles como el maíz y el tomate, cuando la temperatura de crecimiento está por debajo del óptimo se reduce el área y verdor foliar (Venema *et al.* 1999; Hund *et al.* 2008). Las poblaciones en que no hubo modificación del área foliar y

verdor o en todo caso este último aumentó su valor, serían más tolerantes a Tso. Ya que el verdor de las hojas está correlacionado con la cantidad de clorofila presente (Hall 2001). Si el verdor no disminuye, se considera que el daño al aparato fotosintético es pequeño o nulo. Hund *et al.* 2008, observaron que las líneas puras de maíz que aumentaban el verdor foliar a 15/13°C, tenían la misma eficiencia fotosintética que a 17/13°C. Sin embargo en la presente experiencia no se observó que los materiales vegetales que presentaron mayor verdor foliar en Tso mostraran mejoras en la tasa de desarrollo y crecimiento.

El área específica foliar de la Psel 13TF y del híbrido A10xRH432 no bajó en Tso (Tabla 1.12). En maíz se observó que los genotipos con menor área específica a temperatura subóptima, tenían mayor verdor y eficiencia fotosintética, por lo que fueron considerados más tolerantes a esa condición (Hund *et al.* 2005). La disminución del área específica está asociada con una variación en la densidad de la hoja, que principalmente se debe a un aumento del grosor de las paredes celulares, número de células esclerenquimáticas y concentración de metabolitos secundarios. El área específica foliar está correlacionada con la tasa relativa de crecimiento. En general, las especies que presentan bajos valores de área específica y baja tasa de crecimiento están adaptadas a ambientes desfavorables (Lambers *et al.* 2008).

El desarrollo inicial de las poblaciones seleccionadas y sus controles en Tso no produjo daño de las membranas celulares. Por el contrario, en esa condición se observó menor fuga de electrolitos, lo que podría evidenciar buena tolerancia general a la Tso (Tabla 1.12). Cuando los genotipos son sensibles, la exposición a temperatura subóptima puede aumentar notablemente la fuga relativa de electrolitos (Uemura *et al.* 1995; Venema *et al.* 1999; Campos *et al.* 2003; Allinne *et al.* 2009).

Bajo el régimen Tso, el crecimiento relativo del vástago se redujo significativamente en todos los materiales evaluados, salvo en la selección 9TF. Por su parte, el crecimiento relativo foliar no tuvo la misma respuesta. Las selecciones 6TF, 8TF, 13TF así como las RUD AAL, BAR, LMA, RIV y los híbridos, no redujeron el crecimiento relativo foliar con temperatura subóptima. Generalmente, en girasol la tasa de expansión foliar es afectada por la temperatura de la hoja en crecimiento. Granier y Tardieu (1998) observaron que cuando la temperatura foliar disminuía de 25°C a 14°C, la tasa de expansión foliar declinaba marcadamente. También en especies más sensibles como el

maíz y el tomate, temperaturas menores a 10°C, reducen la tasa de expansión foliar (Venema *et al.* 2005; Hund *et al.* 2008).

El biplot correspondiente al análisis conjunto de todas las variables evaluadas (Figura 1.5) destacó a la selección 10TF por la mayor tasa de desarrollo, biomasa seminal y de planta joven, aunque con verdor foliar comparativamente bajo. Además se caracterizó por alta tasa y porcentaje de germinación a temperatura subóptima y sin dormición residual luego de los pretratamientos aplicados a las semillas. Los rasgos medidos posicionan a la población selecta 10TF como un recurso fitogenético de interés para la mejora del desempeño del girasol en siembras a temperaturas inferiores al rango óptimo.

La mejor performance de las Psel 8TF y 10TF probablemente se deba a que contaron con mayor diversidad genética durante la selección por mayor desarrollo en el período fenológico germinación-V2; que permitió obtener genotipos con la mejor combinación genética. A diferencia de las restantes Psel, 8TF y 10TF contaron con el aporte de la variabilidad de todos los recursos silvestres utilizados como fuente de tolerancia, DIATF, AALTF y HaaTF. Mientras que solo uno o dos de estos recursos genéticos intervinieron en la formación de las Psel 6TF, 9TF y 13TF (Figura 1.1). Uno de los factores principales que determina el avance genético es la variación genética total de la población en la cual la selección se halla conducida (Cubero 2003). Según Acquah (2012) un paso crucial es encontrar la fuente del carácter buscado, y si es más de una, la combinación de genes podría producir complementación entre ellos.

Las Psel 8TF y 10TF fueron depositadas en el Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi registradas bajo la denominación CGGI1355 y CGGI1356, respectivamente.

## CONCLUSIONES

A partir de las hipótesis y objetivos de trabajo planteados emergen las siguientes conclusiones:

La selección aumentó la performance a temperatura subóptima durante la etapa de germinación y desarrollo inicial de la planta solo en algunas de las PSEL.

En el ensayo de respuesta de la germinación a la temperatura se observó que la selección produjo la disminución de la temperatura basal del proceso de germinación y el aumento de la tasa de germinación en las PSEL con respecto a las poblaciones RUD e HIB a 5 y 10°C. Entre las PSEL, 8TF y 10TF tuvieron la mejor performance durante la germinación a temperaturas inferiores a 20°C. El atributo funcional de 10TF fue mantener la germinación acumulada por encima del 80% aún a 5°C, y el de 8TF, mayor velocidad de germinación que las RUD e HIB a 10 y 15°C.

Cuando se evaluó el desarrollo temprano de la planta bajo temperatura subóptima la selección 10TF sobresalió por la mayor velocidad de desarrollo de la planta joven. En esta PSEL, contando desde la emergencia la aparición del segundo par de hojas a temperatura subóptima sucedió por lo menos dos días antes que en los HIB y el desarrollo al final del ensayo fue mayor al híbrido HA89xRH274 y a la mayoría de las RUD.

# **CAPÍTULO 2:**

**RESPUESTA ANTE EL DÉFICIT HÍDRICO DE  
POBLACIONES RUDERALES ARGENTINAS DE  
*Helianthus annuus***



## INTRODUCCIÓN

En el 86% de la superficie cultivada a nivel mundial se encuentra bajo el régimen de seco. En estas condiciones, los cultivos suelen estar expuestos a situaciones de sequía, que dependiendo de la severidad, duración, especie y estado de desarrollo, pueden reducir el rendimiento hasta 70% (Andrade y Sadras 2000; Manavalan y Nguyen 2012).

En Argentina, el estrés hídrico es la principal causa de la disminución de la productividad del girasol (Aguirrezábal 2003). Ello es frecuente en la región pampeana, donde el cultivo está expuesto a déficits hídricos estivales, de duración e intensidad variable (Andrade y Sadras 2000). La zona oeste de la región pampeana, la cual comprende el este de la provincia de La Pampa, este de San Luis y el sur de Córdoba, es la más afectada por este fenómeno meteorológico (Funaro *et al.* 2008). Aún así, el 23% de la producción nacional de girasol se cosecha en esta región, con un rendimiento promedio cercano a los 1700 kg ha<sup>-1</sup> (MINAGRI 2016), menos del 50% del rendimiento potencial del cultivo.

En general, el déficit hídrico para el cultivo de girasol comienza alrededor de los 50 días desde la siembra y aumenta a medida que avanza la temporada (Quiroga *et al.* 2008). Si bien el girasol puede completar su ciclo con 550 mm de lluvia (Hall 2007), cuando existe alta disponibilidad hídrica puede aumentar el consumo hasta alcanzar 10 mm día<sup>-1</sup> (ASAGIR 2016). Ello se adjudica a que posee elevada superficie foliar, alta conductividad hídrica y un sistema radical muy desarrollado, que explora horizontes profundos del suelo (Aguirrezábal 2003). Si consume tempranamente el agua almacenada en el perfil del suelo y luego no llueve, el girasol puede entrar en estrés terminal produciendo mermas del rendimiento. Si bien el déficit hídrico disminuye el rendimiento en todas las etapas fenológicas, la floración es la etapa más sensible (Göksoy *et al.* 2004).

Especialmente en tejidos no muy lignificados, el agua debe representar más del 70% de la composición de la biomasa de los vegetales para que los procesos metabólicos y fisiológicos no se vean afectados por deshidratación. Además el agua es necesaria como soporte y para mantener la turgencia de los órganos vegetales (Lambers *et al.* 2008).

En especies vegetales sensibles al estrés hídrico, la escasez de agua disminuye el estado hídrico, lo cual provoca alteraciones en los procesos fisiológicos (Levitt 1980; Golberg

*et al.* 2011). Ello se manifiesta a través de alteraciones en el crecimiento y el desarrollo de la planta, que impactan negativamente sobre la producción (Manavalan y Nguyen 2012).

El proceso más sensible al déficit hídrico es el crecimiento celular de la parte aérea. Frente a estrés hídrico, el crecimiento celular de la parte aérea se reduce antes que la fotosíntesis. El crecimiento radicular es menos sensible a los efectos adversos del estrés por sequía. Si el estrés se prolonga por un período amplio de tiempo, la turgencia celular disminuye gradualmente hasta llegar a la marchitez (Medrano y Flexas 2003 b; Golberg *et al.* 2011; Manavalan y Nguyen 2012).

La fotosíntesis se ve limitada cuando el estrés disminuye el intercambio gaseoso de la planta con la atmósfera. Esto sucede cuando el poro estomático se cierra para evitar la pérdida de agua en condiciones de sequía. Cuando el estrés hídrico es severo, también se observan disturbios metabólicos que afectan desde la captación de la luz, por disminución del contenido de clorofilas y actividad de los fotosistemas, hasta la fijación de dióxido de carbono, por disminución de la actividad enzimática (Levitt 1980; Medrano y Flexas 2003 b).

La consecuencia final del déficit hídrico prolongado es la reducción del tamaño de la planta, del número de hojas, de la capacidad fotosintética y biomasa. Todo ello repercute en una menor producción (Golberg *et al.* 2011).

En girasol, el déficit hídrico puede impactar negativamente en todas las etapas de desarrollo. El efecto sobre el rendimiento dependerá de la o las etapas ontogénicas afectadas, su duración y severidad (Mehrpuoyan *et al.* 2010; Göksoy *et al.* 2004). Antes de la anthesis el déficit hídrico puede reducir en forma importante la biomasa aérea. La superficie foliar, la altura y diámetro del tallo son afectados en mayor medida que el número de hojas (Manivannan *et al.* 2007; Pereyra Irujo *et al.* 2008; Dosio *et al.* 2011). La regulación del área foliar es un rasgo de resistencia a déficit hídrico que permite administrar la pérdida de agua por transpiración en relación con la disponibilidad hídrica (Connor y Sadras 1992). Sin embargo la reducción de la superficie fotosintética puede causar reducción en el rendimiento (Aguirrezábal *et al.* 1996; Andrade y Sadras 2000). En la etapa de formación de la inflorescencia, la producción de flores no se ve afectada por déficit hídrico moderado de corta duración (Dosio *et al.* 2011) pero si bajo déficit

hídrico severo (Marc y Palmer 1976). El número de primordios de flores generados determina el número potencial de frutos, factor asociado con el rendimiento (Aguirrezábal *et al.* 1996). La etapa más sensible al déficit hídrico se observa alrededor del período de floración (Andrade *et al.* 1995; Göksoy *et al.* 2004). El déficit hídrico en la etapa de floración y posfloración reduce el diámetro del capítulo, el número de frutos cuajados por capítulo y el peso de los mismos (Alza y Fernández Martínez 1997; Tahir y Mehdi 2001; Nazariyana *et al.* 2009). Todo ello afecta negativamente el rendimiento del cultivo (Andrade y Sadras 2000; Göksoy *et al.* 2004). Alza y Fernández Martínez (1997) observaron que los genotipos con mayor rendimiento bajo estrés por déficit hídrico tuvieron mayor diámetro de tallo, número de semillas cuajadas por capítulo, peso de las cipselas, diámetro de capítulo y biomasa aérea producida.

El impacto de la sequía sobre el cultivo puede ser mitigado a través de prácticas de manejo que maximicen la captación, acumulación y disminuyan el consumo de agua del perfil del suelo (rotación de cultivos, *mulchs* que reducen la evaporación, control de malezas, ajuste del ciclo del cultivo a períodos de menor demanda hídrica) y/o mediante la utilización de variedades resistentes (Andrade y Sadras 2000; Rauf 2008). Las alternativas que no requieren suministro de nuevos *inputs* o infraestructura, tienen la ventaja de no aumentar los costos de producción. Este es el caso del desarrollo de variedades resistente a sequía.

En un contexto agronómico, se considera que la resistencia a la sequía es la capacidad genética de un cultivo que, mediante la expresión de caracteres morfológicos y fisiológicos (Medrano y Flexas 2003 b; Reigosa y Pedrol 2003; Yoo *et al.* 2009), mantiene el rendimiento bajo condiciones de deficiencia hídrica (Andrade y Sadras 2000).

Las estrategias de las plantas para completar su ciclo de vida en ambientes con déficit hídrico son tres; escape al estrés, evitar el estrés o tolerarlo. El escape consiste en evitar el período estresante, ya que son plantas sensibles al déficit hídrico. Esta es una opción válida si el ciclo del cultivo se puede modificar (Medrano y Flexas 2003 b; Reigosa y Pedrol 2003) y el período con escasas de agua no es de carácter errático (Andrade y Sadras 2000). La evitación o la tolerancia implica actividad metabólica específicamente dirigida para mantener un contenido hídrico elevado, evitar la deshidratación, "evitar el

estrés", o tolerar contenidos hídricos bajos, "tolerar el estrés". Ambas estrategias aumentan la resistencia al déficit hídrico (Medrano y Flexas 2003 b).

En la zona semiárida de la región pampeana, el escape al déficit hídrico estival podría lograrse con siembras tempranas y con el acortamiento del ciclo de cultivo. Estas opciones tienen como desventajas que la emergencia e implantación ocurre con temperaturas subóptimas y que el acortamiento del ciclo de cultivo implica una caída en el rendimiento potencial (Andrade y Sadras 2000).

La resistencia al déficit hídrico manteniendo el contenido hídrico celular, implica la existencia de mecanismos que evitan la deshidratación. Estos se pueden agrupar en los que reducen el gasto de agua, y los que mantienen el abastecimiento de agua. En general, las especies que evitan la deshidratación combinan ambos mecanismos (Medrano y Flexas 2003 b; Reigosa y Pedrol 2003). Una de las formas comunes de medir el estado de hidratación de los tejidos es mediante el contenido relativo de agua (Blum 2011). Este índice es la expresión relativa de la cantidad de agua de un tejido respecto de la cantidad máxima que puede contener.

La cantidad de agua utilizada por el cultivo se puede reducir disminuyendo la transpiración sin causar efectos adversos en la producción. Esto es posible ya que la asimilación de dióxido de carbono se satura antes que la transpiración sea máxima (Yoo *et al.* 2009). El crecimiento en condiciones de déficit hídrico con un uso conservador del agua transpirada aumenta la eficiencia de uso, expresada como la cantidad de agua transpirada por unidad de materia orgánica asimilada (Medrano y Flexas 2003 b).

La transpiración puede disminuir mediante la reducción del crecimiento de la parte aérea. Ello implica menor desarrollo foliar, ya sea por reducción en la tasa de aparición y/o en la tasa de expansión de las hojas. Esta capacidad de aclimatación es usual en especies silvestres y cultivadas (Medrano y Flexas 2003 b; Lambers *et al.* 2008; Blum 2011).

La disminución de la densidad foliar de estomas, su tamaño, grado y control de su apertura, también disminuyen la pérdida de agua desde las hojas. Debe considerarse que a través de los estomas, durante las horas de luz, se pierde el mayor volumen de agua por transpiración (70-95%) (Golberg *et al.* 2011; Manavalan y Nguyen 2012).

La esclerofilia, aumento de espesor de la lámina foliar, cuando está acompañada por una reducción en la superficie foliar, implica disminuir la relación superficie/volumen. Esta modificación morfológica permite reducir la transpiración en mayor medida que la fotosíntesis, ya que la transpiración es función de la superficie foliar y la fotosíntesis del volumen. La esclerofilia se puede medir cuantificando la superficie foliar por biomasa de tejido, lo que se denomina área específica foliar. La disminución del área específica foliar bajo déficit hídrico es una respuesta de aclimatación a este ambiente (Lambers *et al.* 2008), que podría aumentar la eficiencia de uso del agua en condiciones de déficit hídrico (Medrano y Flexas 2003 b).

La transpiración también puede reducirse aumentando la cantidad de pelos sobre la superficie foliar. Los pelos aumentan la reflexión de los rayos solares que inciden sobre la hoja, disminuyen la temperatura y la transpiración. El incremento de la densidad de pelos foliares aumenta el grosor de la capa límite, que también disminuye la transpiración (Medrano y Flexas 2003 b; Golberg *et al.* 2011; Manavalan y Nguyen 2012). Sin embargo, la importancia relativa de este rasgo bajo condiciones de cultivo parecería ser mínima (Yoo *et al.* 2009).

El ajuste osmótico y el aumento de la extensión del sistema radicular (Medrano y Flexas 2003 b; Lambers *et al.* 2008) son mecanismos que favorecen el abastecimiento de agua desde el suelo. En condiciones de déficit hídrico, las plantas con estos rasgos siguen absorbiendo agua, y tienen mayor tasa de transpiración, fotosíntesis y crecimiento que aquellas que no los poseen (Blum 2011; Golberg *et al.* 2011). Una forma de identificar estos genotipos es mediante la medición de la temperatura foliar, ya que la transpiración reduce la temperatura de este órgano. Una temperatura foliar relativamente baja, bajo condiciones de estrés hídrico, indica alta tasa de transpiración y mejor condición hídrica. Se considera que ello permitiría mantener la fijación de carbono atmosférico y el crecimiento bajo estrés por déficit hídrico (Cossani *et al.* 2012; Blum 2016 b).

La capacidad de relocalización de fotoasimilados durante la etapa de llenado de granos es considerada una característica fisiológica asociada a tolerancia a la desecación. En varios cultivos de granos, las reservas se depositan en los tallos durante el crecimiento vegetativo y pueden constituir una fuente muy importante de fotoasimilados para el llenado de granos en situaciones de estrés. Esta característica se observa cuando la fotosíntesis se inhibe y está fuertemente ligada al rendimiento (Blum 2011).

En ambientes donde el déficit hídrico persiste durante un periodo de tiempo prolongado en la estación de crecimiento, las estrategias de resistencia deben ser tendientes a ahorrar el agua disponible (estrategia conservadora). Cuando el déficit hídrico es de corta duración, la mejor estrategia agronómica es la que permite incrementar su disponibilidad (estrategia productivista) (Medrano y Flexas 2003 b; Golberg *et al.* 2011).

El aumento de la resistencia al déficit hídrico en girasol depende de la obtención de germoplasma con constitución genética diversa, que pueda aportar rasgos morfológicos y fisiológicos asociados a esta resistencia (Seiler y Jan 2010; Škorić 2012 a).

Comparado con otros cultivos, el girasol es relativamente resistente al déficit hídrico. Ello es debido a las características particulares de sus órganos aéreos y radiculares (Seiler y Jan 2010). Algunas de las características observadas en variedades de girasol con resistencia a estrés por déficit hídrico son: superficie foliar reducida y alta área específica foliar; el mantenimiento del índice de área foliar con el avance del grado de estrés, la capacidad de realizar ajuste osmótico, sistema radicular con desarrollo profundo y la capacidad de relocalizar reservas desde los tallos hacia las estructuras reproductivas en crecimiento (Andrade y Sadras 2000; Rauf 2008; Škorić 2012 b).

Las poblaciones ruderales argentinas de *Helianthus annuus* podrían aportar nuevos caracteres de resistencia a déficit hídrico ya que la mayoría de ellas se encuentran naturalizadas en la ecoregión del espinal (Poverene *et al.* 2002; Cantamutto *et al.* 2008 a). Esa ecoregión presenta clima húmedo a sub-húmedo (Verbist *et al.* 2010) con deficiencia hídrica en los meses de diciembre y enero que se acentúa hacia el oeste de esta región. Bajo esas condiciones las poblaciones podrían presentar resistencia a estrés por deficiencia hídrica durante la etapa reproductiva.

La detección y selección de individuos con características particulares puede realizarse a nivel esporofítico o a nivel gametofítico (Hormaza y Herrero 1996). En el mejoramiento dirigido de especies domesticadas, la identificación esporofítica de los individuos resistentes ha sido la más frecuentemente utilizada. Sin embargo, bajo condiciones naturales pueden operar ambos tipos de selección (Hormaza y Herrero 1992).

Existe una asociación entre las respuestas gametofíticas y esporofíticas al estrés abiótico o biótico. La expresión genética de rasgos de resistencia a nivel celular sucede tanto en la fase gametofítica como en la esporofítica. Se ha observado entre 60-80% de expresión conjunta de enzimas, ácidos nucleicos y otros compuestos. Por esta razón se pueden considerar a los gametos masculinos como individuos independientes que expresan su propia información genética (Hormaza y Herrero 1992).

A nivel gametofítico, principalmente de gametos masculinos, se ha observado resistencia a factores bióticos y abióticos. Algunos ejemplos son tolerancia a baja temperatura en garbanzo (Clarke *et al.* 2004); a salinidad en cebada (Koval 2000), tolerancia a sequía en sorgo (Ravikumar *et al.* 2003), a *Alternaria helianthi* en girasol (Chikkodi y Ravikumar 2000) y a fusarium en garbanzo (Ravikumar *et al.* 2007). Ravikumar *et al.* (2003) desarrollaron, en sorgo, una técnica que permitió la identificación y selección de individuos resistentes a déficit hídrico a través de la selección micro gametofítica por estrés osmótico durante la fecundación *in vivo* de las flores.

En el presente capítulo se evaluó la performance de cinco poblaciones ruderales argentinas de *H. annuus* bajo condiciones de insuficiencia de abastecimiento hídrico, desde la iniciación floral y hasta la madurez fisiológica, y la presencia de caracteres morfológicos y fisiológicos asociados a resistencia a déficit hídrico.

Las hipótesis y los objetivos planteados fueron:

Hipótesis 1: Las poblaciones ruderales argentinas de *H. annuus* (RUD) poseen resistencia a déficit hídrico desde la iniciación floral y hasta la madurez fisiológica, que les permite su supervivencia y reproducción bajo condiciones deficitaria de abastecimiento hídrico.

Hipótesis 2: Las RUD poseen rasgos morfológicos y fisiológicos distintivos que le otorgan capacidad para resistir deficiencias hídricas en la etapa reproductiva.

Objetivo 1: Explorar la performance de las RUD, mediante la caracterización de su desarrollo y producción en condiciones limitantes de abastecimiento hídrico desde la iniciación floral y hasta madurez fisiológica con el fin de determinar su capacidad para resistir condiciones de déficit hídrico durante estas etapas fenológicas.

Objetivo 2: Identificar, rasgos morfológicos y/o fisiológicos ligados a resistencia a déficit hídrico durante la etapa reproductiva en las RUD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Experimento 1: Respuesta de poblaciones ruderales argentinas de *Helianthus annuus* a deficiencia hídrica durante la fecundación y el desarrollo de los primordios florales**

La respuesta a deficiencia hídrica durante la fecundación, fecundación selectiva (FS), se estudió en una muestra de cinco RUD: AAL, BAR, DIA, LMA y RIV.

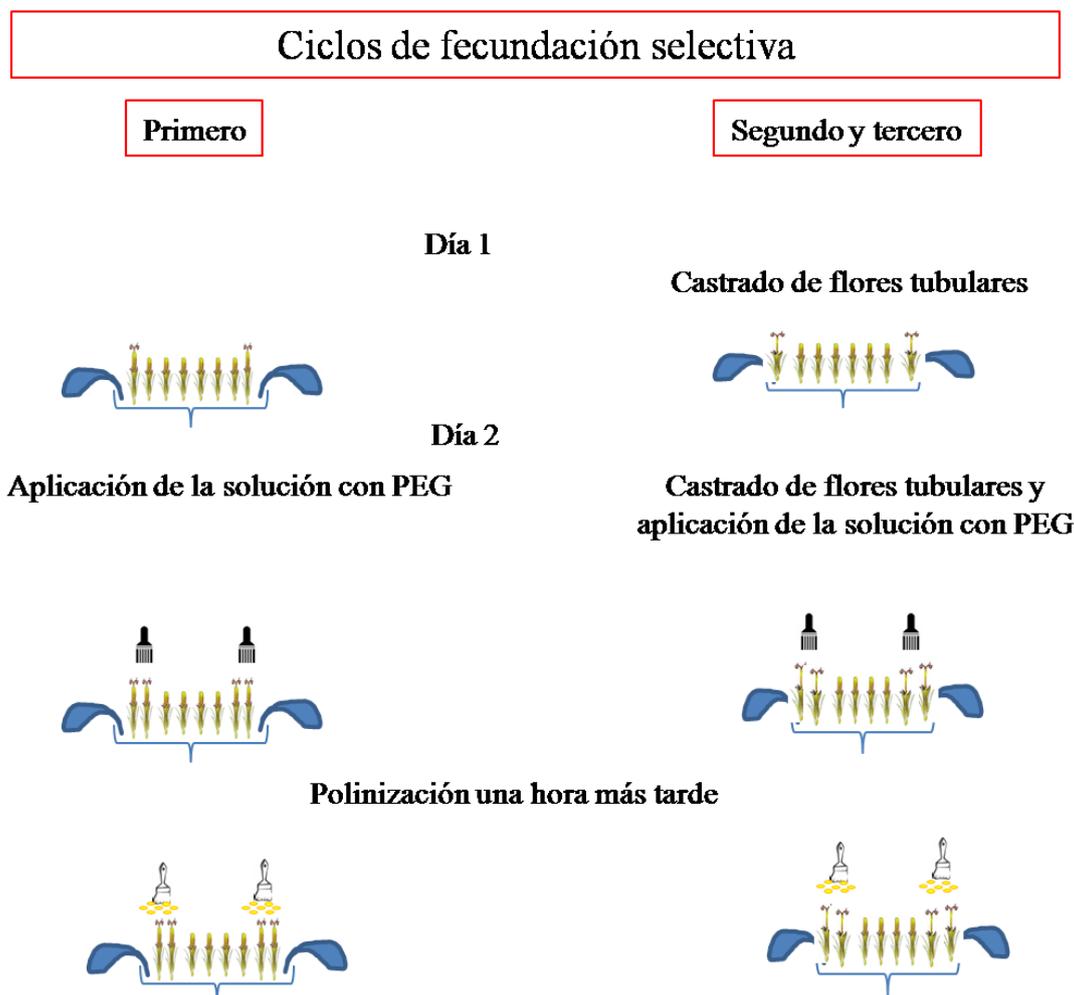
Para realizar la fecundación selectiva se dispersó una solución acuosa de PEG (polietilenglicol, peso molecular 6000) al 30%, sobre los estigmas y estilos de las flores abiertas (Figura 2.1), para causar estrés osmótico durante la germinación de los granos de polen durante la fecundación (Patil *et al.* 2002, Ravikumar *et al.* 2003)

Las cinco RUD fueron cultivadas en un jardín común en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (CE-UNS), S 38° 41' 38'' W 62° 14' 53'', durante la primavera-verano de 2009-10, 2011-12 y 2012-13. Se suministró agua mediante riego por goteo para abastecer la demanda hídrica.

Los capítulos en los que se realizó la obtención de polen y la fecundación selectiva fueron tapados en el estado fenológico R4 (Schneiter y Miller 1981) con bolsas para polinización, de poliamida o papel. Debido al bajo nivel natural de autofecundación de las RUD de Argentina (Presotto 2004), durante el primer ciclo se trabajó con flores sin emasculas. A partir del segundo ciclo las flores se emascularon diariamente antes de la apertura de los estigmas. Dos pinceles de cerdas suaves, exclusivos para cada RUD, se utilizaron para aplicar la solución de PEG 6000 y para esparcir el polen sobre las estructuras florales. La fecundación selectiva se realizó sistemáticamente en 15-30 plantas de cada RUD y en 1-3 capítulos por planta. La cosecha y la trilla de los capítulos se realizó una vez que la planta alcanzó el estado de madurez, R9.

La fecundación selectiva se realizó durante tres años en BAR, LMA y RIV.

**Figura 2.1:** Esquema del procedimiento utilizado en la fecundación selectiva *in vivo* en el primer, segundo y tercer ciclo. El procedimiento descrito se repitió hasta que todas las flores tubulares del capítulo estuvieran abiertas.



Al final de tres ciclos de selección por fecundación selectiva, una muestra de plantas de las RUD seleccionadas (RUD-FS: BAR-FS, LMA-FS y RIV-FS) fueron sujetas a déficit hídrico durante la formación de los primordios de flores del capítulo principal, en condiciones controladas de invernáculo. Como control se utilizaron las líneas endocriadas B59 (susceptible) y B71 (resistente a déficit hídrico), desarrolladas por el INTA Manfredi (Andrade *et al.* 2013; González *et al.* 2014). El 24 de octubre de 2013 las semillas de las RUD-FS fueron escarificadas mecánicamente, y estratificadas a 4-5°C durante una semana (ISTA 2004), para inducir la germinación de semillas dormantes. Luego de ello fueron puestas en condiciones de germinación a temperatura ambiente (20-25°C). Las semillas de las líneas endocriadas no recibieron

pretratamientos y fueron dispuestas para la germinación diez días después que las RUD-FS. La siembra desfasada entre las RUD-FS y las líneas puras permitió sincronizar la etapa reproductiva, ya que esta etapa se observa anticipadamente en las cultivadas.

Una vez observada la germinación, los individuos fueron trasplantados a bandejas multicedas (marca, modelo: ING. CARIUCCIO, MOD 128) rellenas con sustrato MULTIPRO® de Terrafertil, compuesto por turba de musgo *Sphagnum* de fibra media y fina, vermiculita, cal calcita, cal dolomita, agentes humectantes y fertilizante. Las plantas se criaron en invernáculo con riego constante, temperatura controlada 20-25°C. Cuando alcanzaron el estado fenológico V2-V4, 18 plantas elegidas al azar de cada RUD-FS y 16 plantas de cada línea endocriada fueron trasplantadas a macetas de 10 l para continuar el cultivo en invernáculo. El sustrato utilizado para rellenar las macetas fue suelo de los primeros 30-40 cm del perfil, sin antecedentes con girasol del CE-UNS.

Las plantas trasplantadas se mantuvieron con suficiencia de provisión hídrica hasta alcanzar el estado V8-V10 en las RUD y V6-V8 en las líneas endocriadas. El estado fenológico considerado en cada caso fue en el que se produciría la transición a la etapa reproductiva y la iniciación del capítulo (Marc y Palmer 1981; Dosio *et al.* 2006) en el ápice del vástago principal. Ello fue determinado en un experimento previo por el Dr. Presotto y Fernández Moroni, mediante la observación bajo la lupa de la yema apical de tres a cinco plantas de cada material vegetal, criadas de forma similar en un ensayo previo, desde el estado fenológico V4.

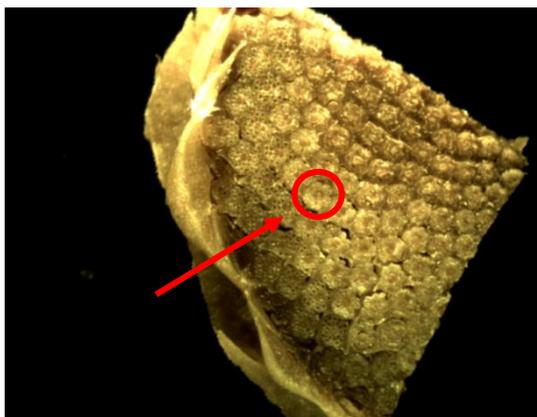
A partir de la iniciación de la etapa reproductiva se realizaron dos tratamientos. Sin estrés hídrico y con estrés hídrico hasta R1. El estrés impuesto fue de -0,8 MPa. Para ello se determinó la curva de retención hídrica del suelo utilizado y se estableció una relación entre la humedad del suelo y el potencial agua del mismo. Esto permitió controlar el estrés impuesto a través de pesadas sucesivas, día por medio. Después del período bajo déficit hídrico se restableció nuevamente una adecuada provisión hídrica.

La respuesta al déficit hídrico se estableció sobre nueve plantas RUD-FS y ocho plantas de cada línea endocriada dispuestas al azar bajo dos tratamientos hídricos.

Cuando las plantas alcanzaron el estado fenológico R2-R3, se cosechó el primordio del capítulo principal. Cada capítulo fue dispuesto en un recipiente con una solución de alcohol y ácido acético en una proporción de 3:1, entre uno y dos días. Luego se

almacenaron en alcohol al 70% hasta que se cuantificó el número de flores formadas por capítulo (FLO). La determinación se realizó sobre una fotografía tomada con una lupa, en una fracción correspondiente a un cuarto de capítulo, sin envolturas bracteales, cortando en forma transversal a la porción superior de las flores (Figura 2.2).

**Figura 2.2:** Vista de un cuarto de capítulo seccionado transversalmente bajo la lupa. Se señaló una de las flores tubulares contabilizadas.



Al estado de cosecha del capítulo se determinó la longitud del vástago principal (LVP) y el ancho foliar de una hoja de la porción media del vástago principal. Con este parámetro se estimó la superficie foliar (SUF) mediante la ecuación 1 o 2 según correspondiera (Aguirrezábal *et al.* 1996).

→Si el ancho foliar se encontraba entre 0-21cm se utilizó la ecuación 1

$$\text{SUF (cm}^2\text{)} = (0,8 \times \text{An}) + (0,697 \times \text{An}^2) \quad [1]$$

→Si el ancho foliar era mayor a 21cm se utilizó la ecuación 2

$$\text{SUF (cm}^2\text{)} = -15,2 + (4,297 \times \text{An}) + (0,565 \times \text{An}^2) \quad [2]$$

Siendo SUF: superficie foliar y An (cm): ancho foliar en la ecuación 1 y 2.

El efecto del menor abastecimiento hídrico sobre el LVP y la SUF respecto de la condición de mayor abastecimiento hídrico, se denominó como respuesta bajo déficit hídrico (Re:). Para determinarla se utilizó la ecuación 3

$$\text{Re: (\%)} = (\bar{X}_i / \bar{X}) \times 100 \quad [3]$$

Siendo Re: Respuesta relativa bajo déficit hídrico del carácter X, X: valor individual del carácter evaluado con estrés hídrico del material vegetal i.  $\bar{X}$ : valor medio del carácter evaluado sin estrés hídrico del material vegetal i.

Otro grupo de treinta plantas de cada RUD-FS no sujetas a estrés, fue trasplantado al CE-UNS cuando tenían entre dos y tres pares de hojas. Las plantas se criaron con buen abastecimiento de agua durante todo su ciclo de cultivo, en un jardín común junto las líneas B59 y B71.

El efecto de la deshidratación se observó en discos foliares de 4 cm de diámetro de hojas de 3-5 plantas que se encontraban en la etapa reproductiva, R1-R5.10, en tres oportunidades distintas. El ensayo consistió en determinar el contenido relativo de agua (CRA) inicial y a los 120 minutos en los discos foliares escindidos, con una metodología similar a la utilizada por Giordani *et al.* (2011). Los discos foliares fueron recolectados cerca de las 9.00 a.m., para que el CRA inicial fuese el máximo posible. Inmediatamente después fueron colocados en cajas de petri dentro de una caja conservadora de telgopor que contenía hielo, para reducir al mínimo la transpiración. En condiciones de laboratorio, con luz artificial fluorescente y entre 29-30°C, se determinó el peso fresco inicial de los discos foliares (PFdf), con una balanza digital con una capacidad de lectura de 0,0001 g. Luego los discos foliares fueron apoyados sobre la base de la caja de petri sin tapa con la superficie abaxial hacia arriba, sobre una mesada. Luego de 120 minutos se pesaron nuevamente. Una vez concluidas las pesadas, los discos foliares se sumergieron en agua destilada durante 16 horas a 4-5°C en oscuridad, para determinar el peso con máxima turgencia (PTdf) y secados a estufa durante dos días a 65-70°C para determinar el peso seco (PSdf). El CRA se determinó según la ecuación 4.

$$\text{CRA (\%)} = (\text{PFdf} - \text{PSdf}) / (\text{PTdf} - \text{PSdf}) \quad [4]$$

Además se estimó la disminución relativa del contenido de agua a 120 minutos (DCA120) respecto de la cantidad de agua al minuto cero, en función de la ecuación 5.

$$DCA(\%)=1-(PFdf_{i120}-PSdf_i)/(PFdf_{i0}/PSdf_i) \quad [5]$$

Siendo DCA: disminución del contenido de agua a los 120 minutos respecto del minuto cero.  $PFdf_i$ : peso fresco del disco foliar de la hoja  $i$  a 120 minutos.  $PSdf_i$ : peso seco del disco de hoja  $i$ .  $PFdf_{i0}$ : peso fresco del disco de la hoja  $i$  al minuto cero.

### **Experimento 2: Respuesta de poblaciones ruderales argentinas de *Helianthus annuus* ante el déficit hídrico durante R1-R9**

Las evaluaciones se realizaron en el CE-UNS, durante la primavera-verano de 2008-09 y 2010-11. El material vegetal estuvo determinado por cinco RUD, AAL, BAR, DIA, LMA y RIV. El híbrido comercial Dekasol (DK) 4000, Syngenta antes Monsato, en 2008-09 y en 2010-11, y la línea pura B71 desarrollada por el INTA Manfredi tolerante a estrés hídrico (Andrade *et al.* 2013; González *et al.* 2014) en 2010-11. Los cultivares se utilizaron como material vegetal control.

La semilla de las RUD se obtuvo mediante regeneración manual utilizando fecundación controlada en un jardín común. El híbrido DK4000 fue provisto por Agronomía Lindón (Bahía Blanca). La línea B71 fue suministrada por el INTA Manfredi.

Las plantas RUD se criaron hasta 4-6 hojas en bandejas de plástico (ING. CARIUCCIO, MOD 200) rellenas con sustrato MULTIPRO® de Terrafertil. Se utilizó semilla estratificada a 4-5°C durante 7 días (ISTA 2004), para inducir la germinación de semillas dormantes. Las plantas de los controles se implantaron mediante siembra directa, al mismo tiempo que el trasplante de las RUD, el 21 de noviembre 2008 y el 10 de noviembre de 2010.

Los materiales vegetales se dispusieron en hileras de 10-15 plantas separadas cada 30 cm. La superficie del suelo estuvo cubierta con polietileno negro de alta densidad (200 micrones) para excluir el agua de lluvia. A 1 m de distancia de los bordes laterales de cada macroparcela ( $n=6$ ), se cultivó sorgo, para contener el crecimiento lateral de las raíces de girasol y consumir el agua lluvia que escurrió entre ellas.

La provisión de agua se realizó semanalmente utilizando cintas de riego por goteo AZUD DRIP® con diámetro de 16 mm cuyo caudal de riego fue de 1,3 l h<sup>-1</sup>, bajo condición de trabajo.

La transpiración potencial del cultivo de girasol fue calculada en función de la evapotranspiración potencial estimada por el CONICET Bahía Blanca durante ese período (Figura 2.3) y el coeficiente basal del cultivo de girasol ( $K_{cb}$ ), el cual se relaciona con la transpiración (TP) de la siguiente forma (López Urrea *et al.* 2014), ecuación 6.

$$TP \text{ (mm)} = \text{evapotranspiración potencial} * K_{cb}; K_{cb} = 0,87 \quad [6]$$

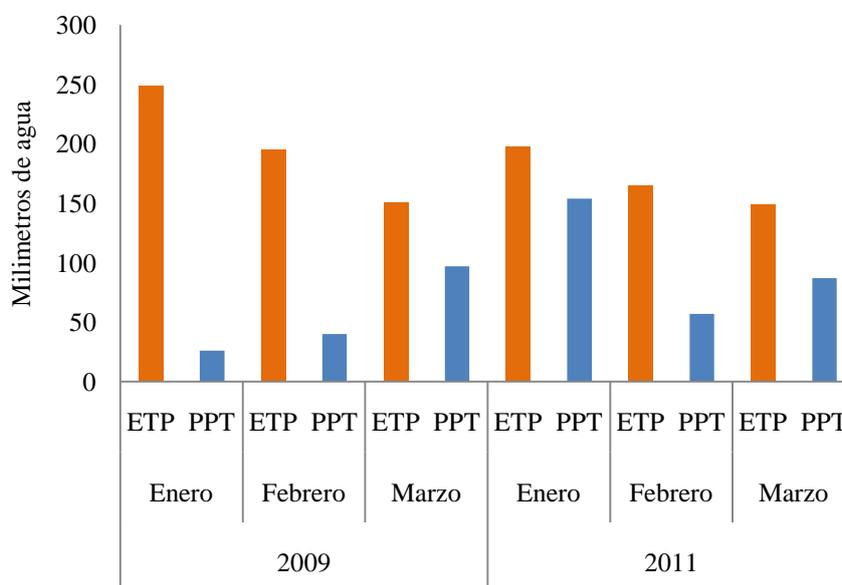
Durante la etapa vegetativa, la cantidad de agua aplicada abasteció la demanda del cultivo. A partir de la visualización del capítulo, estado R1, y hasta el final del ciclo de cultivo, R9, se realizó un tratamiento con mayor abastecimiento hídrico (>AH) y otro con menor abastecimiento hídrico (<AH). Las láminas de riego aplicadas en los regímenes hídricos durante R1-R9 en ambos años de ensayo se describen en la tabla 2.1. Durante R1-R9 la lámina de agua aplicada en 2008-09 representó el 48 y 20%, y en 2010-11 el 42 y 5% de la transpiración potencial del cultivo de girasol en el tratamiento de >AH y <AH respectivamente. En el régimen de >AH las plantas evaluadas no presentaron síntomas visuales de estrés hídrico, salvo en 2008-09 en días muy calurosos.

**Tabla 2.1:** Lámina de riego aplicada durante la etapa reproductiva (R1-R9) del material vegetal en las dos condiciones hídricas exploradas, mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico durante 2009 y 2011.

Ensayo	Riego (mm)					
	Enero		Febrero		Marzo	
	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH
<b>2009</b>	97	48	88	30	0	0
<b>2011</b>	49	4	56	7	23	4

**Figura 2.3:** Evapotranspiración potencial y precipitaciones (mm de agua) ocurridas durante la etapa reproductiva (R1-R9) del material vegetal en los meses de enero, febrero y marzo de 2009 y 2011.

ETP: evapotranspiración potencial. PPT: precipitaciones.



Elaboración propia con datos de PPT de los Boletines Agrometeorológicos Mensuales del Servicio Meteorológico Nacional (SMN 2016) y de ETP cedida por CERZOS/CONICET Bahía Blanca.

El contenido relativo de agua (CRA) en horas de mayor radiación durante las etapas fenológicas incluidas en el rango R4-R6, se estimó en una hoja de la zona media del vástago principal, según la ecuación 4 del experimento 1 (Medrano y Flexas 2003 a). Para ello se escindieron, con un sacabocado, cuatro discos foliares de 1,4 cm de diámetro, que fueron colocados en un tubo de ensayo con tapón dentro de un recipiente térmico que contenía hielo para mantener al mínimo la transpiración. Una vez trasladados al laboratorio se determinó el peso fresco y se colocaron en agua destilada a 4-5°C en oscuridad durante 16 horas. El peso de los discos turgentes se determinó después de secar la superficie foliar con papel absorbente. Luego de ello, los discos fueron secados en estufa a 65-70°C y pesados. Este carácter se midió en más de tres oportunidades utilizando muestras de al menos tres plantas por cada unidad experimental.

A partir de los datos recabados en la determinación del CRA, se estimó el área específica foliar (AES), según la ecuación 7 (Lambers *et al.* 2008).

$$\text{AES (cm}^2 \text{ g}^{-1}\text{)} = \text{SUFdf/PSdf} \quad [7]$$

Siendo AES: área específica foliar, SUFdf: superficie de los discos foliares (1,54 cm<sup>2</sup>), PSdf: peso seco de los discos foliares.

La temperatura foliar (TF) se midió, durante las etapas fenológicas R4 a R6, en otra hoja de la zona media del vástago principal. En por lo menos cinco ocasiones. La temperatura del aire (TA) se computó cada vez que se iniciaba la medición de la TF en una nueva macroparcela.

Con los datos de TA y TF se estableció el delta entre ambas temperaturas (TA-TF), según la ecuación 8.

$$\text{TA-TF (}^\circ\text{C)} = \text{TA}_i - \text{TF}_{ji} \quad [8]$$

Siendo TA-TF: delta entre la temperatura del aire y la temperatura foliar, TA<sub>i</sub>: temperatura del aire en la macroparcela i, TF<sub>ji</sub>: temperatura foliar de la planta j en la macroparcela i.

Durante el período R6 a R7 se determinó la superficie foliar (SUF) y el largo del pecíolo (LPE) de una hoja entera de la porción media del vástago principal. La SUF se construyó a través de la medición del ancho foliar de la hoja, con la ecuación 1 o 2 según correspondiera (Experimento 1).

El verdor foliar (VF) se midió con un SPAD-Minolta-502 en una hoja entera de la porción media del vástago principal durante las etapas fenológicas R6 y R7.

Se determinó el diámetro del capítulo (DCAP), del único capítulo en las variedades cultivadas y de un capítulo terminal de una rama proveniente de la porción media del vástago principal en las RUD, cuando se encontraba en R8.

Cuando finalizó el ciclo del cultivo se midió la altura de la planta (ALT), máxima distancia alcanzada por el vástago principal o vástagos secundarios desde la superficie del suelo; el diámetro del vástago principal (DVP), medido a la mitad de la altura del vástago principal; el número de capítulos (NCA), total de capítulos desarrollados durante el ciclo de cultivo.

En 2010-11 se determinó el número de flores producidas por capítulo (FLO), a partir de la suma de cipselas llenas y vanas contabilizadas en 1/4 del único capítulo en las variedades cultivadas y en 1/2 capítulo terminal de una rama proveniente de la porción media del vástago principal en las RUD.

La biomasa seca de 1000 cipselas (BS1000) fue estimada en función del peso seco de las cipselas llenas mediante secado en estufa por 48 h a 65-70°C, según la ecuación 9.

$$BS1000 (g) = (1000 * PScip) / Ncip \quad [9]$$

Siendo BS1000: la biomasa seca de 1000 cipselas, PScip (g): Peso seco de las cipselas, Ncip: número de cipselas.

A partir de los caracteres medidos en la planta y el capítulo se estimó la superficie reproductiva (SUR), generada a lo largo del ciclo del cultivo, mediante la ecuación 10.

$$SUR (cm^2) = NCA * (\pi * (DCAP/2)^2) \quad [10]$$

Siendo SUR: superficie reproductiva, NCA: número de capítulos,  $\pi$ : número pi (3,1416), DCAP (cm): diámetro del capítulo.

El cuaje (CUAJE), proporción de cipselas llenas respecto del total de flores producidas en un capítulo, según la ecuación 11;

$$CUAJE (\%) = \text{cipselas llenas} / FLO \quad [11]$$

Siendo CUAJE: proporción de cipselas llenas respecto del total de flores producidas en un capítulo y FLO: número de flores producidas por capítulo.

El rendimiento individual por planta (REND), fue estimado con los datos recogidos en 2010-11 con la ecuación 12.

$$\text{REND (g)} = \text{NCA} * \text{FLO} * \text{CUAJE} * (\text{BS1000}/1000) \quad [12]$$

Siendo REND: el rendimiento individual por planta, NCA: número de capítulos, FLO: número de flores por capítulo, CUAJE: cuaje, BS1000: biomasa seca de 1000 cipselas.

Se estableció la respuesta (Re:) de la ALT, el DVP, la SUF, el LPE, el DCAP, el NCA, la SUR, el FLO, el CUAJE, la BS1000, el REND, el AES y el VF bajo <AH, respecto de la condición hídrica más favorable, según la ecuación 3 (Experimento 1).

Las observaciones se realizaron en 5-10 plantas de las poblaciones RUD y 3-10 plantas de los cultivares control en seis macroparcels, de dos metros de ancho por 28,5 metros de largo, tres con régimen hídrico de >AH y tres con régimen de <AH.

La densidad de estomas (DEST) y tricomas (DTRI) se determinó en las dos caras de la superficie foliar de las poblaciones RUD. Como control se utilizó el híbrido comercial DK4000. Las plantas fueron cultivadas en un jardín común sin déficit hídrico en el CE-UNS en 2009-10.

En una hoja madura de la porción media del vástago principal se tomaron moldes de la epidermis abaxial y adaxial según Hernández y Green (1993). Una porción de aproximadamente 1,5x1 cm fue cubierta con polivinilsiloxano hidrofílico (Extrude Wash Kerr Corporation, USA). Cinco minutos después, el material polimerizado, fue removido con una pinza y fijado a un portaobjeto. En el molde negativo que retuvo el relieve de la epidermis se aplicaron dos capas de esmalte sintético incoloro. Una vez seco esta película constituyó el molde positivo utilizado en la evaluación.

El conteo de estomas y tricomas se realizó sobre el molde positivo montado sobre un portaobjeto seco bajo microscopio óptico, provisto de una retícula ocular. El conteo se realizó con un objetivo 10X sobre tres campos de la retícula, calibrada con una escala micrométrica de platina, con una superficie de lectura 0,03 mm<sup>2</sup>. La DEST y DTRI se expresó como número de unidades por mm<sup>2</sup>.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat (actualización 2013).

Mediante la representación gráfica de los residuales en el QQ-plot, obtenidos al realizar el análisis de la varianza (ANOVA), se determinó la normalidad de los datos. Las variables que no presentaban esta condición fueron transformadas antes de su análisis. La disimilitud de los materiales vegetales evaluados produjo que las varianzas fueran heterocedásticas, por ello el ANOVA se realizó con la aplicación de Modelos Lineales Mixtos de InfoStat, que implementa una interfase amigable de la plataforma estadística R (Di Rienzo *et al.* 2012), que permitió tener en cuenta esta situación. Las medias fueron comparadas con el test LSD de Fisher. También se utilizó el test de Student para comparar las respuestas obtenidas entre abastecimientos hídricos.

## RESULTADOS

### **Experimento 1: Respuesta de poblaciones ruderales argentinas de *Helianthus annuus* a deficiencia hídrica durante la fecundación y el desarrollo de los primordios florales.**

Solamente BAR, LMA y RIV toleraron tres ciclos de fecundación mediada por estrés osmótico.

En las tres RUD con fecundación selectiva y en B71 el déficit hídrico no afectó negativamente la generación de primordios florales por capítulo. El déficit hídrico produjo una disminución de la altura en estos materiales vegetales, aunque solo causó la reducción del área foliar en las tres poblaciones RUD con fecundación selectiva. En cambio, en B59 el déficit hídrico mermó la cantidad de primordios florales producidos por capítulo, mientras que la reducción observada en la longitud del vástago principal y la superficie foliar no fue significativa (Tabla 2.2).

El CRA inicial y final, después de 120 minutos de deshidratación, de las RUD con fecundación selectiva fue significativamente mayor a B59 y B71 (Tabla 2.3).

La DCA de las RUD seleccionadas después de 120 minutos de deshidratación fue significativamente menor que B59 y B71. Las RUD con fecundación selectiva perdieron entre 9-11% menos de agua que las líneas endocriadas (Figura 2.4).

**Tabla 2.2:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos (media  $\pm$  error estandar) de poblaciones ruderales de girasol con fertilización selectiva, BAR-FS, LMA-FS y RIV-FS, y las líneas endocriadas, B59 y B71, susceptible y tolerante a estrés hídrico, respectivamente.

Régimen hídrico: menor abastecimiento hídrico (<AH) y mayor abastecimiento hídrico (>AH) durante la iniciación floral-R1. Longitud del vástago (LVP), superficie foliar (SUF) y número de flores por capítulo (FLO).

Material vegetal	LVA (cm)		SUF (cm <sup>2</sup> )		FLO (núm.)	
	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i> con fertilización selectiva</b>						
<b>BAR-FS</b>	135,6 $\pm$ 10,4	108,1 $\pm$ 4,7 *	65,9 $\pm$ 3,2	48,3 $\pm$ 3,2 **	318 $\pm$ 19	315 $\pm$ 16 ns
<b>LMA-FS</b>	135,8 $\pm$ 5,9	111,6 $\pm$ 6,0 *	66,8 $\pm$ 6,3	49,2 $\pm$ 2,8 *	353 $\pm$ 33	395 $\pm$ 27 ns
<b>RIV-FS</b>	135,4 $\pm$ 4,4	114,3 $\pm$ 3,9 **	65,4 $\pm$ 6,0	50,5 $\pm$ 4,9 *	267 $\pm$ 20	269 $\pm$ 13 ns
<b>Variedades cultivadas de girasol sin fertilización selectiva</b>						
<b>B59</b>	84,7 $\pm$ 2,1	78,5 $\pm$ 2,2 ns	66,3 $\pm$ 6,2	53,0 $\pm$ 5,0 ns	655 $\pm$ 43	498 $\pm$ 43 *
<b>B71</b>	76,5 $\pm$ 2,0	66,4 $\pm$ 1,2 **	48,8 $\pm$ 5,9	51,3 $\pm$ 3,6 ns	495 $\pm$ 64	522 $\pm$ 25 ns

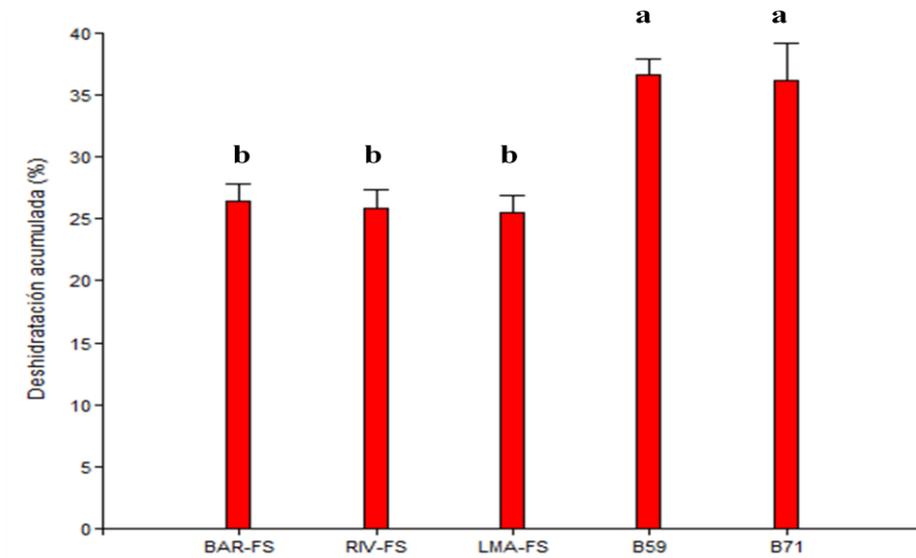
Test de Student entre tratamientos hídricos: \*, \*\* y ns, altamente significativo ( $p < 0,01$ ), significativo ( $p < 0,05$ ) y no significativo, respectivamente.

**Tabla 2.3:** Contenido relativo de agua (CRA, media  $\pm$  error estandar) en discos foliares de plantas de BAR-FS, LMA-FS, RIV-FS, B59 y B71. Valor inicial de plantas sin déficit hídrico (minuto cero: 0') y luego de 120 minutos de deshidratación (120').

Material vegetal	CRA (%)	
	0'	120'
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i> con fertilización selectiva</b>		
<b>BAR-FS</b>	83,9 $\pm$ 1,0 a	61,8 $\pm$ 1,5 a
<b>LMA-FS</b>	83,2 $\pm$ 1,2 a	61,9 $\pm$ 1,4 a
<b>RIV-FS</b>	83,1 $\pm$ 1,3 a	61,5 $\pm$ 0,9 a
<b>Variedades cultivadas de girasol sin fertilización selectiva</b>		
<b>B59</b>	76,5 $\pm$ 1,3 b	48,5 $\pm$ 1,5 b
<b>B71</b>	79,0 $\pm$ 1,3 b	50,3 $\pm$ 2,3 b
<b>ANOVA</b>	**	**

ANOVA: datos transformados por el arcoseno( $\sqrt{p}$ ). Para su análisis se utilizó Modelos Lineales Mixtos, aplicando el modelo varIdent para corregir la falta de homogeneidad de las varianzas de los materiales vegetales. P-valor:  $p < 0,01$  (\*\*). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.

**Figura 2.4:** Deshidratación acumulada relativa al contenido de agua inicial (%) de discos foliares expuestos al aire durante 120 minutos de BAR-FS, LMA-FS, RIV-FS, B59 y B71.



ANOVA: datos transformados por el  $\arcsen(\sqrt{p})$ . Para su análisis se utilizó Modelos Lineales Mixtos, aplicando el modelo varIdent para corregir la falta de homogeneidad de las varianzas. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre materiales vegetales  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.

## **Experimento 2: Respuesta de poblaciones ruderales argentinas de *Helianthus annuus* ante el déficit hídrico durante R1-R9**

La altura de las plantas se redujo bajo déficit hídrico (Tabla 2.4). La población BAR y el cultivar DK4000 tuvieron la menor depresión de la altura bajo esta condición hídrica. Por su parte DIA redujo más del 20% la altura, superando a BAR y DK4000. La disminución de la altura de las plantas por estrés hídrico del resto de los materiales fue intermedia entre los dos extremos (Tabla 2.6).

El diámetro del vástago principal se situó entre 1 y 3 cm en ambos regímenes hídricos. En general, <AH provocó una disminución en el diámetro del vástago en las RUD y las variedades cultivadas (Tabla 2.4). Estadísticamente, la reducción observada bajo <AH en AAL y RIV no fue significativa y menor a 10%, al igual que la línea B71 (resistente a estrés hídrico). En cambio, reducciones significativas se observaron en DIA (2008-09 y 2010-11), BAR, LMA (ambos casos en 2008-09) y DK4000 (2010-11). Las reducciones observadas en estos casos fueron superiores a 10% (Tabla 2.6).

El cultivo con <AH redujo el largo del pecíolo y la superficie de las hojas de todos los materiales incluyendo los controles. La superficie foliar de las RUD con >AH se estableció entre 163-419 cm<sup>2</sup> y el largo del pecíolo entre 14-21 cm, mientras que bajo <AH fue entre 143-364 cm<sup>2</sup> y 11-21 cm, respectivamente. En las variedades cultivadas la superficie foliar fue entre 190-485 cm<sup>2</sup> y el largo del pecíolo entre 9-16 cm bajo >AH, mientras que con menor disponibilidad hídrica fue entre 134-313 cm<sup>2</sup> y 11-21 cm, respectivamente (Tabla 2.4).

El déficit hídrico afectó negativamente la superficie foliar de DK4000 (2008-09 y 2010-11), BAR y LMA (2008-09), y DIA (2010-11). Estos materiales vegetales, junto con B71 redujeron más de 25% la superficie foliar bajo <AH. Mientras que AAL y RIV tuvieron reducciones menores a 22% bajo esta condición hídrica, que no fueron estadísticamente significativas en 2008-09 ni en 2010-11 (Tabla 2.4). La reducción relativa de la superficie foliar en respuesta al <AH fue menor en AAL, BAR, DIA y RIV que en DK4000 (Tabla 2.6).

Además de la superficie foliar, DK4000 (2008-09 y 2010-11), LMA y DIA (2008-09), y AAL (2008-09 y 2010-11) redujeron significativamente el largo del pecíolo, más de 20%, bajo <AH (Tabla 2.4). Las RUD BAR y RIV tuvieron una reducción relativa en

respuesta al <AH del largo del pecíolo significativamente inferior a AAL, LMA, DIA y DK4000 (Tabla 2.6).

El diámetro del capítulo de las RUD, cuyo valor se ubicó entre 3-5 cm en ambas condiciones hídricas, fue la mitad o menos del observado en las variedades cultivadas. En las RUD el diámetro del capítulo no disminuyó significativamente bajo <AH, salvo en DIA durante 2010-11. En las variedades cultivadas, el diámetro del capítulo se redujo significativamente en DK4000 (2008-09 y 2010-11), no así en B71 (Tabla 2.5). En estos materiales vegetales la reducción del diámetro del capítulo observada fue mayor al 20%. La reducción relativa del diámetro del capítulo de AAL en respuesta al <AH fue menor que el de las variedades cultivadas, no obstante entre AAL y las demás RUD no hubo diferencias estadísticas (Tabla 2.6).

El número de capítulos producidos durante 2008-09 bajo <AH, disminuyó significativamente en todas las RUD, salvo en RIV. En 2010-11 solo en DIA el déficit hídrico causó este efecto perjudicial (Tabla 2.5). Las RUD BAR (2008-09), LMA (2008-09) y DIA (2008-09 y 2010-11) tuvieron una reducción superior al 30% del número de capítulos bajo <AH (Tabla 2.6).

En general, el <AH produjo menor superficie reproductiva. En la condición de >AH la superficie reproductiva se situó entre 287-1510 cm<sup>2</sup> y 97-330 cm<sup>2</sup>, y con <AH entre 299-870 cm<sup>2</sup> y 71-213 cm<sup>2</sup>, respectivamente para las RUD y las variedades cultivadas. En 2008-09 la superficie reproductiva producida mermó significativamente en todos los materiales vegetales, salvo en AAL y RIV (Tabla 2.5). El <AH causó una reducción mayor al 40% en BAR (2008-09), DIA (2008-09 y 2010-11) y LMA (2008-09). La RUD RIV fue el material vegetal con menor reducción de este carácter bajo <AH, estadísticamente superior a los restantes materiales vegetales, salvo a AAL que tuvo una respuesta similar (Tabla 2.6).

**Tabla 2.4:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos vegetativos de planta (media  $\pm$  error estandar) en poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol.

Regímenes hídricos: mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico. ALT: altura de planta. DVP: diámetro del vástago principal. SUF: superficie foliar. LPE: largo del pecíolo.

Material vegetal	ALT (cm)		DVP (cm)		SUF (cm <sup>2</sup> )		LPE (cm)	
	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i></b>								
<i>2008-09</i>								
<b>AAL</b>	228,5 $\pm$ 5,1	192,5 $\pm$ 6,8**	2,2 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1ns	213,7 $\pm$ 27,4	228,9 $\pm$ 20,6ns	17,9 $\pm$ 0,9	13,3 $\pm$ 1,0**
<i>2020-11</i>								
	216,8 $\pm$ 8,9	181,8 $\pm$ 10,7**	1,7 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1ns	280,6 $\pm$ 37,5	220,5 $\pm$ 26,8ns	18,5 $\pm$ 1,4	14,3 $\pm$ 1,1*
<i>2008-09</i>								
<b>BAR</b>	220,2 $\pm$ 6,3	184,3 $\pm$ 6,6**	1,9 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1**	268,3 $\pm$ 19,2	195,0 $\pm$ 16,3**	14,2 $\pm$ 1,0	13,6 $\pm$ 1,0ns
<i>2020-11</i>								
	197,8 $\pm$ 9,4	187,0 $\pm$ 9,0ns	1,6 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1ns	234,3 $\pm$ 19,0	234,9 $\pm$ 18,5ns	14,4 $\pm$ 1,0	15,3 $\pm$ 1,2ns
<i>2008-09</i>								
<b>DIA</b>	178,5 $\pm$ 7,7	140,3 $\pm$ 4,8**	1,8 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1*	163,8 $\pm$ 16,1	195,5 $\pm$ 13,0ns	14,8 $\pm$ 0,9	11,3 $\pm$ 0,5**
<i>2020-11</i>								
	185,6 $\pm$ 5,6	132,4 $\pm$ 4,6**	1,5 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1**	217,9 $\pm$ 16,0	152,3 $\pm$ 10,7**	14,0 $\pm$ 0,8	13,8 $\pm$ 0,9ns
<i>2008-09</i>								
<b>LMA</b>	259,4 $\pm$ 7,3	196,0 $\pm$ 6,7**	2,7 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1**	399,5 $\pm$ 32,8	227,2 $\pm$ 20,0**	16,5 $\pm$ 0,9	12,7 $\pm$ 0,7**
<i>2020-11</i>								
	278,1 $\pm$ 17,6	248,9 $\pm$ 14,1ns	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1ns	347,9 $\pm$ 31,5	363,1 $\pm$ 42,1ns	17,7 $\pm$ 0,7	15,9 $\pm$ 0,7ns
<i>2008-09</i>								
<b>RIV</b>	240,35 $\pm$ 9,1	204,4 $\pm$ 9,5**	1,8 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1ns	266,8 $\pm$ 25,9	226,4 $\pm$ 17,4ns	15,8 $\pm$ 0,8	14,8 $\pm$ 0,6ns
<i>2020-11</i>								
	273,3 $\pm$ 8,3	223,5 $\pm$ 10,7**	1,8 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1ns	261,9 $\pm$ 18,6	208,2 $\pm$ 22,1ns	16,4 $\pm$ 0,7	15,7 $\pm$ 0,3ns
<b>Variedades cultivadas</b>								
<i>2008-09</i>								
<b>DK4000</b>	140,8 $\pm$ 1,4	124,5 $\pm$ 2,7**	2,1 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1ns	432,1 $\pm$ 22,9	312,1 $\pm$ 18,9**	14,6 $\pm$ 0,6	11,5 $\pm$ 0,5**
<i>2020-11</i>								
	143,3 $\pm$ 5,3	122,4 $\pm$ 5,6*	2,4 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1**	484,3 $\pm$ 32,8	293,4 $\pm$ 31,8**	16,0 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 0,7**
<i>2010-11</i>								
<b>B71</b>	123,9 $\pm$ 6,7	107,6 $\pm$ 6,9ns	1,2 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2ns	252,0 $\pm$ 52,7	179,1 $\pm$ 50,5ns	9,6 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 1,2ns

Se utilizó el test de Student entre tratamientos hídricos: \*, \*\* y ns: altamente significativo ( $p < 0,01$ ), significativo ( $p < 0,05$ ) y no significativo, respectivamente. La SUF fue transformada por Ln para su análisis estadístico.

**Tabla 2.5:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos reproductivos (media  $\pm$  error estandar) de planta en poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol.

Regímenes hídricos: mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico. DCAP: diámetro del capítulo. NCA: número de capítulos por planta. SUR: superficie reproductiva

Material vegetal	DCAP (cm)		NCA (núm.)		SUR (cm <sup>2</sup> )	
	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i></b>						
<i>2008-09</i>						
<b>AAL</b>	4,4 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,1ns	56 $\pm$ 5	41 $\pm$ 5*	846,2 $\pm$ 85	704,2 $\pm$ 95ns
<i>2010-11</i>						
	4,2 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,2ns	31 $\pm$ 5	34 $\pm$ 7ns	460,3 $\pm$ 52	450,9 $\pm$ 39ns
<i>2008-09</i>						
<b>BAR</b>	4,3 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,2ns	81 $\pm$ 6	39 $\pm$ 7**	1284,1 $\pm$ 164	562,3 $\pm$ 112**
<i>2010-11</i>						
	3,9 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1ns	54 $\pm$ 5	54 $\pm$ 8ns	685,3 $\pm$ 87	662,1 $\pm$ 115ns
<i>2008-09</i>						
<b>DIA</b>	3,9 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,1ns	47 $\pm$ 8	29 $\pm$ 3*	607,6 $\pm$ 119	357,6 $\pm$ 36*
<i>2010-11</i>						
	4,2 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,1**	62 $\pm$ 7	35 $\pm$ 4**	849,7 $\pm$ 92	334,0 $\pm$ 51**
<i>2008-09</i>						
<b>LMA</b>	4,8 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,1ns	74 $\pm$ 9	28 $\pm$ 3**	1510,0 $\pm$ 230	459,7 $\pm$ 79,3**
<i>2010-11</i>						
	4,9 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,4ns	47 $\pm$ 7	58 $\pm$ 11ns	981,0 $\pm$ 173	868,9 $\pm$ 191ns
<i>2008-09</i>						
<b>RIV</b>	3,9 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1ns	49 $\pm$ 7	58 $\pm$ 6ns	652,3 $\pm$ 108	711,0 $\pm$ 88ns
<i>2010-11</i>						
	3,8 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1ns	48 $\pm$ 4	43 $\pm$ 5ns	564,3 $\pm$ 64	470,9 $\pm$ 72ns
<b>Variedades cultivadas</b>						
<i>2008-09</i>						
<b>DK4000</b>	17,7 $\pm$ 0,4	16,3 $\pm$ 0,5*	1	1	249,6 $\pm$ 13	213,0 $\pm$ 12*
<i>2010-11</i>						
	20,3 $\pm$ 0,6	15,9 $\pm$ 0,8**	1	1	329,1 $\pm$ 21	211,9 $\pm$ 20**
<i>2010-11</i>						
<b>B71</b>	10,7 $\pm$ 1,1	10,1 $\pm$ 1,4ns	1	1	97,5 $\pm$ 19	89,4 $\pm$ 30ns

Se utilizó el test de Student entre tratamientos: \*, \*\* y ns: altamente significativo ( $p < 0,01$ ), significativo ( $p < 0,05$ ) y no significativo, respectivamente.

**Tabla 2.6:** Respuesta relativa (**Re**; %) de caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos de planta, bajo menor (<AH) abastecimiento hídrico respecto de la condición de mayor abastecimiento (>AH), de poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol.

ALT: altura de planta. DVP: diámetro del vástago principal. SUF: superficie foliar. LPE: largo del pecíolo. DCAP: diámetro del capítulo. NCA: número de capítulos por planta. SUR: superficie reproductiva.

Material vegetal	Re:						
	ALT	DVP	SUF	LPE	DCAP	NCA	SUR
Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i>							
AAL	84,0 ab	95,3	94,4 a	75,6 b	101,4 a	89,4	90,0 ab
BAR	89,0 a	89,8	85,5 a	99,8 a	96,5 ab	72,5	69,5 bd
DIA	75,2 b	82,3	98,1 a	85,8 b	91,6 ab	59,3	49,6 d
LMA	81,9 ab	81,6	77,2 ab	82,5 b	95,1 ab	73,4	53,3 d
RIV	83,7 ab	93,3	82,8 a	94,6 a	96,8 ab	106,2	98,0 a
Variedades cultivadas							
DK4000	87,1 a	86,1	67,2 b	78,4 b	86,0 b	100	76,3 bc
B71	86,8 ab	91,8	71,1 ab	99,4 ab	94,5 b	100	91,7 cd
ANOVA	**	Ns	**	**	**	ns	**

ANOVA: valor medio, datos transformados mediante la estandarización de la media en cada ensayo. P-valor:  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*), sin diferencias estadísticas  $p > 0,05$  (ns). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.

El número de flores por capítulo tendió a disminuir bajo <AH, aunque ello fue solo significativo para B71 en 2010-11 (Tabla 2.7). Las variedades cultivadas tuvieron las reducciones más elevadas, mayores a 18%. En las RUD la reducción más marcada fue en BAR, 12,8%. La disminución del número de flores por capítulo en respuesta al <AH de B71 fue significativamente mayor a DK4000 y las RUD (Tabla 2.8).

Cuando el cultivo se realizó bajo >AH el cuajado cuajadas fue entre 60-75% y 73-87%, mientras que bajó a 53-81% y 54-81% con <AH, para las RUD y las variedades cultivadas respectivamente. Si bien en algunos materiales vegetales se observaron disminuciones del cuajado bajo <AH, el efecto no fue estadísticamente significativo (Tabla 2.7). En efecto del menor <AH sobre el cuajado de los frutos fue menor en AAL, BAR y DIA que en B71. Sin embargo no se establecieron diferencias estadísticas entre las RUD (Tabla 2.8).

La biomasa de mil cipselas varió entre 7-14 g y 40-68 g bajo >AH y entre 7-15 g y 36-57 g bajo <AH, en las RUD y las variedades cultivadas respectivamente. La biomasa seminal disminuyó significativamente bajo <AH solo en DK4000 en 2008-09 y 2010-11 (Tabla 2.7). La reducción fue mayor a 15% en ambas oportunidades. AAL también tuvo reducciones similares a DK4000, aunque estadísticamente no significativas. En cambio, en los restantes materiales vegetales la disminución fue inferior al 13% y hasta en algunos casos se observaron aumentos. El más destacado en RIV en 2010-11, de 16,2%.(Tabla 2.8).

**Tabla 2.7:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos reproductivos a nivel de capítulo y el rendimiento individual por planta (media  $\pm$  error estandar), de poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol.

Tratamientos hídricos: mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico. FLO: número de flores por capítulo. BS1000: biomasa de mil cipselas. REND: rendimiento individual por planta.

Material vegetal	FLO (núm.)		CUAJE (%)		BS1000 (g)		REND (g)	
	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i></b>								
<b>2008-09</b>								
<b>AAL</b>	--	--	--	--	9,9 $\pm$ 0,8	8,6 $\pm$ 0,6 ns	--	--
	<b>2010-11</b>							
	421 $\pm$ 24	431 $\pm$ 32ns	73,9 $\pm$ 5,4	79,7 $\pm$ 4,3ns	11,0 $\pm$ 1,0	8,9 $\pm$ 0,7ns	56,1 $\pm$ 6,4	57,9 $\pm$ 5,0ns
<b>2008-09</b>								
<b>BAR</b>	--	--	--	--	7,7 $\pm$ 0,4	7,8 $\pm$ 0,4 ns	--	--
	<b>2010-11</b>							
	384 $\pm$ 20	334 $\pm$ 19ns	74,4 $\pm$ 3,5	80,10 $\pm$ 2,9ns	10,1 $\pm$ 0,8	9,5 $\pm$ 0,5ns	82,9 $\pm$ 10,5	99,7 $\pm$ 17,3ns
<b>2008-09</b>								
<b>DIA</b>	--	--	--	--	9,9 $\pm$ 0,8	9,1 $\pm$ 0,7 ns	--	--
	<b>2010-11</b>							
	362 $\pm$ 22	345 $\pm$ 22ns	71,2 $\pm$ 4,4	80,7 $\pm$ 9,1ns	10,3 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 0,4ns	82,9 $\pm$ 10,5	52,0 $\pm$ 7,9**
<b>2008-09</b>								
<b>LMA</b>	--	--	--	--	13,1 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,6 ns	--	--
	<b>2010-11</b>							
	513 $\pm$ 48	486 $\pm$ 42ns	60,4 $\pm$ 5,8	53,6 $\pm$ 21,6ns	12,4 $\pm$ 0,9	14,8 $\pm$ 2,1ns	140,3 $\pm$ 24,7	141,6 $\pm$ 31,2ns
<b>2008-09</b>								
<b>RIV</b>	--	--	--	--	7,5 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 0,4 ns	--	--
	<b>2010-11</b>							
	388 $\pm$ 31	346 $\pm$ 29ns	72,6 $\pm$ 4,4	61,8 $\pm$ 30,5ns	8,7 $\pm$ 0,5	10,1 $\pm$ 0,8ns	66,3 $\pm$ 7,5	46,5 $\pm$ 7,1ns
<b>Variedades cultivadas</b>								
<b>2008-09</b>								
<b>DK4000</b>	--	--	--	--	67,6 $\pm$ 2,7	57,0 $\pm$ 2,9*	--	--
	<b>2010-11</b>							
	1915 $\pm$ 236	1567 $\pm$ 102ns	86,8 $\pm$ 1,3	80,2 $\pm$ 3,1ns	64,9 $\pm$ 3,0	44,5 $\pm$ 3,3**	103,8 $\pm$ 6,5	68,8 $\pm$ 6,5**
<b>2010-11</b>								
<b>B71</b>	1595 $\pm$ 151	639 $\pm$ 114**	73,0 $\pm$ 4,3	54,7 $\pm$ 11,0ns	40,0 $\pm$ 3,2	36,5 $\pm$ 5,1ns	30,7 $\pm$ 5,9	24,0 $\pm$ 5,2ns

Se utilizó el test de Student entre tratamientos hídricos: \*, \*\* y ns: altamente significativo ( $p < 0,01$ ), significativo ( $p < 0,05$ ) y no significativo, respectivamente. El FLO fue transformado por Ln para su análisis estadístico

**Tabla 2.8:** Respuesta relativa (Re;; %) de caracteres morfológicos reproductivos a nivel de capítulo y rendimiento individual por planta bajo la condición de menor abastecimiento hídrico (<AH) respecto de la condición de mayor abastecimiento (>AH) durante la etapa reproductiva R1-R9.

FLO: número de flores por capítulo. BS1000: biomasa de mil cipselas. REND: rendimiento individual por planta.

Material vegetal	Re:			
	FLO	CUAJE	BS1000	REND
	(%)			
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i></b>				
AAL	102,1a	107,7 a	83,5 b	103,2 a
BAR	87,2 ab	107,7 a	98,5 a	112,6 a
DIA	93,2 ab	113,9 a	95,6 a	59,2 b
LMA	94,6 ab	88,9 ab	96,1 a	100,9 ab
RIV	89,2 ab	85,2 ab	104,6 a	70,1 ab
<b>Variedades cultivadas</b>				
DK4000	81,8 b	92,5 ab	74,6 b	66,3 b
B71	40,0 c	74,9 b	91,3 ab	78,0 ab
ANOVA	**	**	**	**

ANOVA: datos transformados mediante la estandarización de la media en cada ensayo. P-valor:  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*), sin diferencias estadísticas  $p > 0,05$ (ns). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.

La TF aumentó significativamente, entre 0,8 y 4,1°C bajo <AH, en BAR y DIA en 2008-09 y 2010-11, y en LMA, RIV y DK4000 en 2008-09 (ensayo con mayor déficit hídrico atmosférico); también en B71 en 2010-11. Mientras que la TF de AAL fue similar en ambos regímenes hídricos. La TF varió entre 24-29°C y entre 24-31°C bajo >AH y <AH, respectivamente (Tabla 2.9). Bajo <AH, la TF estandarizada más baja se observó en AAL y RIV, mientras DIA y B71 tuvieron las más altas (Tabla 2.10).

La TA-TF se situó entre 6-11°C y 4-9°C bajo >AH y <AH, respectivamente. La TA-TF fue estadísticamente menor bajo <AH en DIA, DK4000 y B71 en 2008-09 y 2010-11, en BAR y LMA en 2008-09 y en AAL en 2010-11. Mientras que RIV mantuvo el gradiente de temperatura, en 2008-09 y 2010-11 (Tabla 2.9). AAL tuvo la TA-TF estandarizada más grande bajo <AH, similar respuesta tuvo RIV, ambas difirieron

estadísticamente de BAR, DIA, LMA y B71 que tuvieron menor gradiente térmico entre el aire y la hoja (Tabla 2.10).

El CRA bajo >AH en 2008-09 (39-72%) fue menor al observado en 2010-11 (71-87%). El CRA tuvo la tendencia a ser inferior bajo <AH, aunque en 2008-09 no se observaron diferencias entre regímenes hídricos como en 2010-11. RIV fue el único material vegetal que bajo <AH mantuvo similar valor de CRA que en la condición de >AH en 2008-09 y 2010-11 (Tabla 2.9). Además esta población tuvo el CRA estandarizado más alto bajo <AH, estadísticamente mayor a los restantes materiales vegetales evaluados (Tabla 2.10).

El verdor foliar se estableció entre 35-43 y 29-40 unidades SPAD bajo >AH, respectivamente para las RUD y las variedades cultivadas. Bajo <AH se observó un ligero aumento, entre 0,4-5,5 unidades SPAD, en la mayoría de las RUD y las variedades cultivadas, cuyos valores se ubicaron entre 35-48 y 31-42 unidades SPAD, respectivamente. Sin embargo este aumento solo fue significativo en AAL y DIA en 2008-09. Contrariamente, en LMA el verdor foliar disminuyó levemente bajo <AH, en ambos ensayos (Tabla 2.9). En LMA la reducción del verdor foliar en respuesta al <AH, fue mayor que en el resto de los materiales vegetales (Tabla 2.10).

El área específica foliar varió entre 93-142  $\text{cm}^2\text{g}^{-1}$  y 126-144  $\text{cm}^2\text{g}^{-1}$  cuando la disponibilidad hídrica fue mayor y cuando disminuyó varió entre 93-123  $\text{cm}^2\text{g}^{-1}$  y 131-139  $\text{cm}^2\text{g}^{-1}$ , respectivamente para las RUD y las variedades cultivadas. En LMA, RIV, B71 y DK4000 el área específica no se modificó bajo menor disponibilidad hídrica. Por el contrario en AAL y BAR se redujo significativamente más de 10%, en ambos ensayos. En DIA el área específica solo disminuyó significativamente en 2008-09 (Tabla 2.9). Se observaron dos grupos distintos respecto de la respuesta del área específica foliar; uno en el cual el AES se redujo más de 10% bajo <AH, el cual incluyó a AAL, BAR y DIA; y otro en que este parámetro casi no tuvo reducción o presentó un leve aumento, que incluyó a LMA, RIV, DK4000 y B71 (Tabla 2.10).

**Tabla 2.9:** Efecto del déficit hídrico sobre caracteres morfológicos y fisiológicos foliares (media  $\pm$  error estándar), de poblaciones ruderales y variedades cultivadas de girasol.

Regímenes hídricos: mayor (>AH) y menor (<AH) abastecimiento hídrico. CRA: contenido relativo de agua. TF: temperatura foliar, TA-TF: delta entre la temperatura del aire y la TF. VF: verdor foliar. AES: área específica foliar.

Material vegetal	CRA (%)		TF (°C)		TA-TF (°C)		VF (unidades SPAD)		AES (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	
	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH	>AH	<AH
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i></b>										
<i>2008-09</i>										
AAL	59,9 $\pm$ 6,4	51,9 $\pm$ 4,4ns	27,1 $\pm$ 0,3	27,9 $\pm$ 0,3ns	9,6 $\pm$ 0,3	8,8 $\pm$ 0,2ns	39,7 $\pm$ 0,7	42,0 $\pm$ 0,6*	123,4 $\pm$ 4,3	104,5 $\pm$ 5,8*
	<i>2010-11</i>									
	85,3 $\pm$ 1,0	78,6 $\pm$ 1,7**	25,9 $\pm$ 0,3	26,5 $\pm$ 0,5ns	7,6 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,4*	35,9 $\pm$ 0,8	37,7 $\pm$ 0,9ns	119,1 $\pm$ 5,6	96,7 $\pm$ 3,6**
<i>2008-09</i>										
BAR	53,6 $\pm$ 6,7	52,7 $\pm$ 4,4ns	27,0 $\pm$ 0,4	29,3 $\pm$ 0,4**	9,6 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,3**	41,8 $\pm$ 0,6	43,4 $\pm$ 1,1ns	131,3 $\pm$ 6,7	111,9 $\pm$ 5,0*
	<i>2010-11</i>									
	86,2 $\pm$ 1,0	79,2 $\pm$ 1,7**	25,5 $\pm$ 0,2	26,3 $\pm$ 0,3*	7,1 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,4ns	40,7 $\pm$ 1,1	42,5 $\pm$ 1,4ns	124,3 $\pm$ 5,2	110,8 $\pm$ 3,0*
<i>2008-09</i>										
DIA	40,3 $\pm$ 2,3	49,6 $\pm$ 3,9ns	26,0 $\pm$ 0,3	30,1 $\pm$ 0,3**	10,6 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,3**	41,8 $\pm$ 0,7	47,3 $\pm$ 0,6**	132,8 $\pm$ 6,4	116,6 $\pm$ 1,8*
	<i>2010-11</i>									
	83,3 $\pm$ 1,5	73,3 $\pm$ 1,4**	25,3 $\pm$ 0,3	27,3 $\pm$ 0,5**	7,7 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 0,5**	42,3 $\pm$ 1,0	43,8 $\pm$ 1,2ns	141,9 $\pm$ 8,4	122,3 $\pm$ 11,3ns
<i>2008-09</i>										
LMA	67,4 $\pm$ 6,0	63,1 $\pm$ 1,1ns	27,3 $\pm$ 0,3	29,8 $\pm$ 0,3**	9,2 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,3**	41,5 $\pm$ 1,2	41,1 $\pm$ 1,2ns	112,9 $\pm$ 4,3	118,2 $\pm$ 7,1ns
	<i>2010-11</i>									
	84,2 $\pm$ 2,5	74,4 $\pm$ 1,4*	25,6 $\pm$ 0,4	25,1 $\pm$ 0,4ns	6,9 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 0,6ns	38,9 $\pm$ 1,1	36,8 $\pm$ 1,3ns	113,1 $\pm$ 6,8	119,8 $\pm$ 8,0ns
<i>2008-09</i>										
RIV	71,9 $\pm$ 1,5	67,4 $\pm$ 1,3ns	28,1 $\pm$ 0,3	29,1 $\pm$ 0,3*	8,4 $\pm$ 0,3	7,6 $\pm$ 0,3ns	39,2 $\pm$ 0,9	42,3 $\pm$ 1,3ns	93,9 $\pm$ 3,6	93,5 $\pm$ 4,0ns
	<i>2010-11</i>									
	80,5 $\pm$ 0,8	82,5 $\pm$ 1,0ns	24,6 $\pm$ 0,3	24,7 $\pm$ 0,3ns	8,6 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 0,4ns	33,0 $\pm$ 0,8	35,4 $\pm$ 0,9ns	112,9 $\pm$ 6,8	111,4 $\pm$ 3,9ns
<b>Variedades cultivadas</b>										
<i>2008-09</i>										
DK4000	39,1 $\pm$ 1,2	36,4 $\pm$ 1,2ns	26,1 $\pm$ 0,3	28,9 $\pm$ 0,2**	10,7 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,2**	39,7 $\pm$ 0,8	41,1 $\pm$ 0,5ns	134,6 $\pm$ 5,9	138,5 $\pm$ 3,8ns
	<i>2010-11</i>									
	82,5 $\pm$ 1,5	72,8 $\pm$ 1,8**	26,4 $\pm$ 0,4	27,2 $\pm$ 0,3ns	6,5 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 0,5*	35,0 $\pm$ 0,6	36,3 $\pm$ 0,5ns	126,8 $\pm$ 7,0	131,2 $\pm$ 11,9ns
<i>2010-11</i>										
B71	80,4 $\pm$ 2,6	71,3 $\pm$ 0,9*	25,5 $\pm$ 0,7	27,6 $\pm$ 0,6*	7,8 $\pm$ 0,9	4,9 $\pm$ 0,7*	29,7 $\pm$ 0,8	31,7 $\pm$ 0,9ns	143,8 $\pm$ 5,6	137,3 $\pm$ 11,2ns

Test de Student entre tratamientos hídrico: \*, \*\* y ns: altamente significativo ( $p < 0,01$ ), significativo ( $p < 0,05$ ) y no significativo, respectivamente. El CRA fue transformado por el arcoseno ( $\sqrt{\text{CRA}/100}$ )

**Tabla 2.10:** Temperatura foliar (TF), delta entre la temperatura del aire y la TF (TA-TF) y contenido relativo de agua (CRA) bajo la condición de menor abastecimiento hídrico y respuesta relativa (**Re;** %) del área específica (AES) y el verdor foliar (VF) en la condición de menor abastecimiento hídrico (<AH) respecto de la condición de mayor abastecimiento (>AH) durante la etapa reproductiva R1-R9. Media de los valores obtenidos en 2008-09 y 2010-11.

Material Vegetal	TF (°C)	TA-TF (°C)	CRA (%)	Re: (%)	
				AES	VF
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i></b>					
AAL	27,4 c	8,1 a	65,2 bc	83,4 b	105,3 ab
BAR	28,1 b	6,9 cd	64,6 b	87,3 b	104,1 ab
DIA	29,3 a	6,2 d	60,8 cd	88,3 b	108,4 a
LMA	28,7 b	7,2 cd	64,3 bc	107,6 a	96,8 c
RIV	27,5 c	7,7 ab	74,0 a	99,4 a	107,5 ab
<b>Variedades cultivadas</b>					
DK4000	28,4 b	7,3 bc	54,6 d	103,9 a	103,8 ab
B71	27,6 a	4,9 d	70,3 d	106,4 a	107,0 ab
ANOVA	**	**	**	**	**

Valor medio ensayos 2008-09 y 2010-11. ANOVA: datos transformados mediante la estandarización de la media en cada ensayo. P-valor:  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*), sin diferencias estadísticas  $p > 0,05$  (ns). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.

La densidad estomática y de tricomas de la superficie abaxial, entre 332-388 estomas  $\text{mm}^{-2}$  y 22-33 tricomas  $\text{mm}^{-2}$ , fueron mayores que en la superficie adaxial, 247-292 estomas  $\text{mm}^{-2}$  y 17-29 tricomas  $\text{mm}^{-2}$ , en todos los materiales vegetales evaluados (Tabla 2.11).

LMA presentó la menor densidad de estomas y tricomas en ambas superficies foliares, junto con RIV en la cara abaxial. RIV fue la RUD con menor densidad de tricomas en ambas superficies foliares (Tabla 2.11).

DIA fue la población con más estomas y tricomas por unidad de superficie foliar, y presentó la menor relación entre la densidad de estomas y tricomas. En cambio en RIV la cantidad de estomas respecto de la cantidad de tricomas por unidad de superficie fue mayor que en las restantes poblaciones (Tabla 2.11).

**Tabla 2.11:** Densidad de estomas (DEST) y tricomas (DTRI) (número mm<sup>-2</sup>) y relación DEST/DTRI en la superficie abaxial (Sab) y adaxial (Sad) de hojas (media ± error estandar) de poblaciones ruderales de girasol y el híbrido DK4000.

Material vegetal	DEST		DTRI		DEST/DTRI	
	Sad	Sab	Sad	Sab	Sad	Sab
	(núm. mm <sup>-2</sup> )		(núm. mm <sup>-2</sup> )			
<b>Poblaciones ruderales de <i>H. annuus</i></b>						
<b>AAL</b>	268±11 ab	384±12 ab	24±1 b	29±1 a	11,2±0,4 c	13,3±0,3 c
<b>BAR</b>	291±12 a	388±6 a	22±1 bc	31±1 a	13,3±0,6 b	12,8±0,5 c
<b>DIA</b>	292±10 a	381±11 ab	29±1 a	33± a	10,1±0,5 c	11,7±0,4 c
<b>LMA</b>	247±7 b	332±12 c	20±1 cd	22±1 b	13,0±0,6 b	15,0±0,6 b
<b>RIV</b>	271±7 ab	361±9,2 bc	17±1 d	22±1 b	16,4±0,7 a	16,5±0,4 a
<b>Variedad cultivada</b>						
<b>DK4000</b>	272±15 ab	378±14 ab	25±1 b	28±3 a	11,0±0,6 c	14,0±1,2 bc
<b>ANOVA</b>	**	**	**	**	**	**

ANOVA: P-valor: p<0,01 (\*\*), p<0,05 (\*), sin diferencias estadísticas p>0,05(ns). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre filas en una misma columna, p<0,05 según test LSD Fisher. DPEL: transformado por raíz cuadrada para su análisis.

## DISCUSIÓN

Los materiales vegetales evaluados presentaron grandes diferencias constitutivas; debido a que las poblaciones RUD provienen de introducciones de girasol no domesticado, con características similares a las poblaciones silvestres del centro de origen (Presotto *et al.* 2011). Las RUD se diferencian claramente del girasol por poseer intensa ramificación, ausencia de predominancia apical y capítulos pequeños. Debido a estas diferencias constitutivas, la resistencia al estrés hídrico se valoró a través de la expresión de los parámetros morfológicos y fisiológicos medidos con y sin la influencia del déficit hídrico en cada material vegetal, de forma similar a lo realizado por Tahir y Medhi (2001), Tahir *et al.* (2002) y Rauf (2008).

La disminución en el abastecimiento hídrico desde la iniciación de la etapa reproductiva-R1 (Experimento 1) y durante R1-R9, (Experimento 2) disminuyeron el crecimiento de la parte aérea vegetativa de todos los materiales. Esta reducción fue un efecto generalizado del estrés hídrico. Ello se observó a pesar de que el girasol se considera un cultivo moderadamente resistente al déficit hídrico (Connor y Sadras 1992). En las plantas, ello ocurre porque el proceso fisiológico más sensible a este estrés es la elongación celular, sobretodo de la parte aérea. El crecimiento celular se detiene aún antes que la fotosíntesis ante la escases de agua (Levitt 1980; Chaves *et al.* 2002; Medrano y Flexas 2003 b; Lambers *et al.* 2008).

La biomasa aérea del girasol está compuesta por un vástago principal del cual nacen numerosas hojas (Trápani *et al.* 2003). Bajo déficit hídrico, estas estructuras reducen su elongación produciendo plantas más bajas con hojas más pequeñas (Tahir *et al.* 2002; Göksoy *et al.* 2004; Manivannan *et al.* 2007; Pereyra Irujo *et al.* 2008). En general, cuando se produce reducción en el crecimiento y en el área fotosintética se observa una disminución de la producción de estructuras reproductivas y fotoasimilados (Andrade y Sadras 2000) que disminuye el rendimiento, como han observado Tahir *et al.* (2002) y Göksoy *et al.* (2004).

La reducción de la superficie foliar también puede considerarse una estrategia de conservación del agua disponible, ya que con menor superficie foliar se reduce la cantidad potencial de agua transpirada (Medrano y Felxas 2003 b; Lambers *et al.* 2008). El girasol es un cultivo que tiene la capacidad de regular su superficie foliar en función

de la cantidad de agua disponible (Andrade y Sadras 2000). Blum (2011) considera que bajo déficit hídrico severo, la reducción de la superficie foliar es un rasgo deseado, aunque implique menor rendimiento potencial, ya que es más importante la conservación del recurso escaso.

El tallo también tiene importancia agronómica, ya que los tallos más gruesos son menos susceptibles al vuelco (Hall *et al.* 2010). Además en este órgano se almacenan fotoasimilados (Martínez Noël *et al.* 2015), en mayor proporción antes de la floración, que en condiciones de estrés pueden ser removilizados y utilizados para el llenado de granos, por ejemplo durante sequías terminales (Hall *et al.* 1989, 1992; Andrade y Sadras 2000), como la simulada en el presente trabajo. Los tallos y pecíolos también contribuyen con la producción de fotoasimilados (Connor y Sadras 1992).

En este trabajo, el efecto negativo de la limitación hídrica sobre la estructura vegetativa de la planta, altura de la planta, diámetro del vástago principal, superficie foliar individual y largo del pecíolo, fue diferente según el material vegetal.

RIV fue el material vegetal con menor reducción en el crecimiento de la estructura vegetativa bajo déficit hídrico, sobre todo en aquellos componentes que son fuente de fotoasimilados como hojas y tallos, menor a 24% en el experimento 1, y 21% en el experimento 2. La línea tolerante B71 tuvo similar performance que RIV bajo insuficiencia hídrica. Aunque la disminución de la superficie foliar fue significativamente mayor, más de 25% en el experimento 2. AAL también tuvo buena performance, aunque a diferencia de RIV y B71, el largo del pecíolo foliar disminuyó de forma más pronunciada en ambos años de estudio (Experimento 2). En el experimento 2, DIA fue el material vegetal que mostró el comportamiento más negativo sobre la estructura vegetativa bajo déficit hídrico y disminuyó más de 20% la altura de las plantas y más de 14% el diámetro del tallo.

El déficit hídrico disminuyó en los materiales vegetales más sensibles el número de flores por capítulo, el cuaje y la biomasa de las cipselas, respuesta congruente con lo observado por otros autores (Connor y Sadras 1992; Egli 1998; Trápani *et al.* 2003). Sin embargo la respuesta no fue igual en todos los materiales vegetales. En el experimento 1, solo B59 (línea susceptible) disminuyó significativamente el número de flores generadas en el capítulo principal. En cambio la línea resistente B71 y, las poblaciones

RIV, LMA y BAR con fecundación selectiva mantuvieron el número de flores formadas bajo esta condición hídrica. Este rasgo en los materiales vegetales más resistentes es valioso, ya que en la etapa de formación de las estructuras reproductivas se determina el número potencial de frutos, principal componente del rendimiento (Connor y Sadras 1992). En el experimento 2, se observaron disminuciones significativas en la biomasa de las cipselas de DK4000 y en el número de flores por capítulo de B71. En cambio las RUD no tuvieron modificaciones significativas bajo déficit hídrico en estos caracteres. Probablemente las diferencias observadas entre experimentos en la respuesta de B71 en el número de flores por capítulo bajo déficit hídrico, se deba a que probablemente el déficit hídrico impuesto no haya sido similar entre experiencias. En este último aspecto se pueden encontrar ejemplos que permiten vislumbrar que el nivel de estrés aplicado causa distintos tipos de respuesta sobre el órgano evaluado. Por ejemplo Dosio *et al.* (2011) no evidenciaron disminuciones en el número de flores formadas bajo estrés moderado y de corta duración en girasol, en cambio Marc y Palmer (1976) observaron una reducción del 80% del número de flores formadas por capítulo con estrés hídrico severo. Posiblemente el menor cambio observado en las RUD bajo estrés hídrico en el experimento 2 también se deba a que, a diferencia de las variedades cultivadas, pudieron ajustar el rendimiento no solo a través de la modificación de los componentes numéricos del rendimiento inherentes al capítulo, sino también a través del número de capítulos producidos por planta. Egli (1998) menciona que las variaciones en el rendimiento del cultivo de soja, el cual presenta numerosas estructuras reproductivas (vainas) dispersas sobre el esqueleto vegetativo de la planta, como en las RUD, son principalmente debidas al número de vainas formadas, mientras que la cantidad de semillas por vaina se mantiene más estable. Una respuesta similar a la mencionada se observó en DIA, que bajo déficit hídrico no tuvo modificaciones estadísticas del número de flores por capítulo, el peso de las cipselas y el cuaje, sin embargo el rendimiento por planta disminuyó más del 40%. Esta merma estuvo principalmente causada por una reducción en la cantidad de capítulos producidos, que disminuyó el total de la superficie reproductiva. El mero análisis de los componentes de rendimiento por sí solos no indica resistencia o susceptibilidad al déficit hídrico de los materiales vegetales evaluados. Se deberían considerar en conjunto con el rendimiento por planta, ya que entre los componentes mencionados existe compensación, y el aumento de uno puede estar ligado a la disminución de otro, lo que puede o no modificar el rendimiento (Egli 1998). Por ejemplo en 2010-11 el rendimiento de AAL bajo estrés no cambió, aunque la

biomasa de las cipselas disminuyó 19%, ya que se observó compensación a través del número de flores y frutos formados por capítulo. Además en un programa de mejoramiento vegetal bajo déficit hídrico, el principal objetivo es mejorar el rendimiento de los cultivos bajo esta condición hídrica.

La superficie reproductiva fue estimada a partir del diámetro y del número de capítulos por planta, asumiendo que estos tienen una superficie plana y circular. La construcción de este parámetro se realizó para subsanar las diferencias de ramificación entre los biotipos. En el experimento 2 la reducción de la superficie reproductiva de AAL y RIV bajo déficit hídrico no fue significativa. Por el contrario, DK4000 y DIA redujeron más de 14% la superficie reproductiva bajo estrés por déficit hídrico. Los materiales vegetales que tuvieron menor superficie reproductiva y rendimiento con déficit hídrico, también presentaron alta reducción de la estructura vegetativa de la planta.

El contenido relativo de agua y la temperatura foliar pueden reflejar la alteración del estado hídrico de las plantas, causado por menor abastecimiento hídrico (Rauf 2008). En las plantas cultivadas la evitación de la deshidratación es la estrategia más buscada (Blum 2016 b).

En el experimento 1, el contenido relativo de agua inicial de RIV, LMA y BAR con fecundación selectiva fue mayor que en B59 y B71; y la deshidratación de los discos foliares fue entre un 8-11% menor. Las hojas pueden regular la transpiración mediante el movimiento estomático. Este es el mecanismo más rápido que tienen los vegetales para adaptarse a cambios en la cantidad de agua disponible. Para aumentar la eficiencia en la transpiración se debe reducir la apertura estomática. La menor pérdida de agua registrada en las RUD con fecundación selectiva puede deberse a una mayor capacidad de regular la apertura estomática, que permitiría disminuir la conductancia estomática bajo estrés hídrico. Este es uno de los principales mecanismos involucrados en la regulación de la pérdida de agua desde las hojas (Yoo *et al.* 2009), atributo deseado en condiciones de déficit hídrico. Pou *et al.* (2008) mencionan que la mejor capacidad de regular la apertura estomática en un híbrido entre dos especies de vides le proporcionó resistencia al déficit hídrico, ya que la fina regulación de la pérdida de agua le permitió aumentar la eficiencia de uso del agua.

En el experimento 2, en 2008-09 el contenido relativo de agua fue menor y la temperatura foliar mayor que en el 2010-11, estas diferencias podrían deberse a que en el primer ensayo las condiciones atmosféricas durante la etapa reproductiva fueron más desecantes, precipitaciones menos abundantes (Figura 2.3). Estas condiciones climáticas habrían producido en el 2008-09 que el contenido relativo de agua en la condición hídrica favorable fuese menor al esperado, 80-90% (Kaiser 1987; Panković *et al.* 1999; Lambers *et al.* 2008) y habría causado que la disminución del contenido relativo de agua observado bajo menor abastecimiento hídrico no fuese estadísticamente significativo. El contenido relativo de agua refleja la turgencia celular. La disminución de la turgencia por debajo de su valor normal limita la expansión celular y el crecimiento de estructuras vegetativas y reproductivas (Jaleel *et al.* 2009; Taiz y Zeiger 2010), más que la actividad fotosintética. Ya que cuando el contenido relativo de agua es mayor al 30% (Kaiser 1987), la principal limitante de este proceso es la disponibilidad de CO<sub>2</sub>, generalmente disminuida por una reducción en la conductancia estomática (Panković *et al.* 1999; Flexas *et al.* 2006). Cuando el contenido relativo de agua disminuye por debajo este valor, sí se produce daño en las estructuras celulares que inhiben irreversiblemente el aparato fotosintético (Levitt 1980; Kaiser 1987). La RUD RIV fue la población con menor deshidratación bajo estrés hídrico ya que tuvo el mayor contenido relativo de agua y no mostró mermas significativas respecto de la condición hídrica más favorable en ambos experimentos. Además RIV mantuvo la diferencia de temperatura entre el aire y las hojas bajo deficiencia hídrica respecto de la condición hídrica favorable.

La temperatura foliar está inversamente relacionada con la transpiración. Mayor transpiración indica mayor apertura estomática, mayor intercambio gaseoso, mayor fotosíntesis y menor temperatura foliar (Poormohammad Kiani *et al.* 2007; Rauf 2008). Los materiales vegetales que presentan menor temperatura foliar, tienen mejor rendimiento bajo déficit hídrico (Blum 2016 b). En el presente trabajo la temperatura foliar de RIV y AAL fueron las más bajas con estrés hídrico, mientras que la superficie reproductiva y el rendimiento permanecieron sin cambios significativos. Por el contrario, DIA y DK4000 experimentaron la mayor reducción de la superficie reproductiva y del rendimiento con estrés hídrico, también tuvieron los valores más bajos de contenido relativo de agua y alta temperatura foliar.

En función de la respuesta observada en la temperatura foliar, el gradiente de temperatura y el contenido relativo de agua bajo déficit hídrico en RIV y AAL, podría especularse que estas RUD poseen rasgos fisiológicos que le permiten mantener el abastecimiento de agua desde el suelo hacia la planta bajo esta condición hídrica. Los mecanismos conocidos que otorgan esta capacidad son el ajuste osmótico, disminución del potencial agua de las células a través de la acumulación activa de compuestos osmóticamente activos y/o mayor capacidad radicular propia o a través de la asociación con micorrizas que permitirían explorar el perfil del suelo en búsqueda de agua (Medrano y Flexas 2003 b). Atributos que podrían mejorar la capacidad del cultivo para producir en condiciones de déficit hídrico durante la etapa reproductiva.

La medición del verdor permite inferir la cantidad de clorofilas en las hojas. El dispositivo SPAD 502 minolta, permite su estimación *in situ*, sin causar daño a los tejidos (Richardson *et al.* 2002). En el experimento 2 se comparó el cambio relativo del verdor foliar entre las condiciones hídricas. El verdor de las hojas de LMA disminuyó ligeramente bajo déficit hídrico, a diferencia de los restantes materiales evaluados cuyo valor aumentó. El estrés hídrico puede producir disminución en el contenido de clorofila de las hojas, como indica Jaleel *et al.* (2009) y, en girasol Manivannan *et al.* (2007) y Ghobadi *et al.* (2013). La reducción en el contenido de clorofila puede ser un mecanismo de defensa para disminuir la absorción lumínica, que en exceso genera compuestos radicales libres que degeneran las membranas biológicas (Flexas *et al.* 2006). Sin embargo en cebada, trigo, maíz y girasol los genotipos más resistentes a estrés hídrico fueron aquellos que presentaron menor reducción de la cantidad de clorofila en sus hojas (Rong Hual *et al.* 2006; Frazad *et al.* 2007; Messmer *et al.* 2011; Ghaffari *et al.* 2012). Los materiales con mayor nivel de aumento en el verdor de sus hojas bajo estrés hídrico fueron RIV, AAL, DIA y B71. Las dos primeras RUD fueron las que mejor conservaron la estructura vegetativa y reproductiva bajo esta condición hídrica.

La disminución del área específica foliar bajo déficit hídrico es una respuesta de aclimatación de las plantas, que le confiere ventajas en ambientes desfavorables, como baja disponibilidad hídrica y nutricional (Lambers *et al.* 2008). Esta característica, bajo deficiencia hídrica, puede aumentar la eficiencia de uso del agua ya que en general las hojas con menor área específica son más pequeñas y más gruesas. Esta modificación de la morfología foliar produce una mayor disminución de la transpiración que de la

fotosíntesis, porque el primer proceso es función solamente de la superficie foliar, mientras que en la fotosíntesis también es función del volumen (Medrano y Flexas 2003 b). En girasol (Panković *et al.* 1999) , amaranto (Liu y Stützel 2004) y maní (Songsri *et al.* 2009) el crecimiento bajo estrés hídrico produjo la disminución del área específica foliar. Songsri *et al.* (2009) observaron una relación negativa de este carácter con la eficiencia de uso del agua en maní y en amaranto, en cambio Liu y Stützel (2004) advirtieron que todos los cultivares evaluados que reducían el área específica foliar aumentaban la eficiencia de uso del agua bajo déficit hídrico. En el experimento 2 se observó una disminución significativa del área específica foliar en AAL, uno de los materiales más resistentes al déficit hídrico impuesto, aunque también ello se observó en DIA uno de los más sensibles. El área específica foliar de RIV se mantuvo casi inalterable, mientras que en LMA y DK4000 aumentó ligeramente con estrés hídrico.

Otras modificaciones estructurales de las hojas que permiten evitar el estrés hídrico son una menor densidad estomática y/o mayor pilosidad, ya que reducen el gasto de agua disminuyendo la transpiración (Medrano y Flexas 2003 b). En concordancia con los autores anteriores, Yu *et al.* (2008) y Yoo *et al.* (2010) en *Arabidopsis*, Mehri *et al.* (2009) en trigo, y Liu *et al.* (2012) en arroz observaron que la reducción de la densidad estomática aumentó la tolerancia al déficit hídrico. En sorgo, Muchow y Sinclair (1989) observaron que la conductancia epidérmica disminuyó cuando la densidad estomática fue menor.

En este trabajo LMA tuvo la densidad estomática baja y DIA la densidad de pelos más alta, en ambas superficies foliares, sin embargo estas RUD no tuvieron la mejor performance bajo déficit hídrico. En cambio RIV, con mayor resistencia al déficit hídrico, tuvo la menor densidad de pelos y la cantidad de estomas por pelo más alta en ambas superficies foliares. Aunque en la cara abaxial la densidad de estomas fue relativamente baja.

La búsqueda de genotipos con una mejor performance bajo déficit hídrico se puede realizar tanto a nivel esporofítico, como se ha descrito hasta el párrafo anterior en el presente trabajo, como a nivel gametofítico (Ravikumar *et al.* 2003). Es esperable que en el gametofito masculino se expresen genes que le permitan aclimatarse a los factores externos como sucede en el esporofito (Hormaza y Herrero 1992). Estos autores mencionan que la performance de la germinación *in vitro* o *in vivo* y/o la fecundación

de polen expuestos a baja temperatura, salinidad, metales y compuestos tóxicos como herbicidas, fue diferente en función de la constitución genética del polen. Lo que indica que la búsqueda de genotipos con mejor performance puede llevarse a cabo a través de la respuesta de los gametos masculinos al estrés.

En este trabajo la aplicación de estrés osmótico sobre las estructuras reproductivas femeninas se realizó con el objetivo de que la fecundación de los óvulos solo se realice con los granos de polen capaces de germinar bajo un potencial agua de -1 MPa; denominado fecundación selectiva. Este experimento fue iniciado en las cinco RUD, sin embargo DIA y AAL no produjeron suficiente cantidad de semillas en el segundo ciclo de selección (menos de 15 semillas) para continuar con el proceso de selección. En estas RUD la escasa formación de semillas posiblemente se haya debido a una escasa fecundación causada por el estrés osmótico producido sobre el polen, lo que probablemente haya originado una disminución de la viabilidad de estas estructuras, ya que la aplicación de la solución con PEG se realizó sobre los estigmas de las flores antes de la polinización. La técnica aplicada en este experimento fue similar a la utilizada por Ravikumar *et al.* (2003) en sorgo, aunque estos autores no mencionan dificultades en la obtención de semillas. En cambio en las RUD BAR, LMA y RIV, el estrés impuesto por el PEG no inhibió tan fuertemente la fecundación y se obtuvo suficiente cantidad de semillas para continuar con el proceso de selección.

La población RIV con tres ciclos de fecundación selectiva fue depositada en el Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfred, registrada bajo la denominación CGGI1357

## CONCLUSIONES

A partir de las hipótesis y objetivos de trabajo planteados emergen las siguientes conclusiones:

Las poblaciones ruderales argentinas de *H. annuus* poseyeron resistencia a déficit hídrico impuesto durante la etapa reproductiva, que les permitió su supervivencia y reproducción. Sin embargo el efecto negativo de la limitación hídrica sobre la estructura vegetativa y reproductiva de la planta fue diferente según el material vegetal. Entre las RUD, RIV fue la población con mayor resistencia al déficit hídrico impuesto.

En RIV los rasgos observados que probablemente hayan contribuido con la mejor performance reproductiva bajo déficit hídrico fueron:

- ✓ reducción moderada de la superficie foliar (menor a 25%, experimento 1 y 2),
- ✓ reducción moderada de la altura (menor a 20%, experimento 1 y 2),
- ✓ reducción leve del diámetro del vástago principal (menor a 10%, experimento 1),
- ✓ capacidad de mantener el abastecimiento de agua desde el suelo hacia la planta (gradiente térmico foliar conservado, experimento 2),
- ✓ buen contenido de agua en los tejidos (mayor 70%, experimento 2),
- ✓ capacidad de controlar la pérdida de agua desde los tejidos foliares, (deshidratación después de 120 minutos: 26%, experimento 1)
- ✓ mantenimiento del verdor foliar (aumento 7%, experimento 2),
- ✓ capacidad para mantener el número de primordios florales formados por capítulo (sin reducción, experimento 1),
- ✓ preservación de la fertilidad (fecundación con estrés osmótico, experimento 1),
- ✓ reducción leve del número de granos formados (menor a 15%, experimento 2)
- ✓ preservación de la biomasa de las cipselas formadas (sin reducción, experimento 2).



# **CAPÍTULO 3:**

**CONFORMACIÓN DE UN STOCK GENÉTICO DE  
GIRASOL CON RESISTENCIA AL *VIRUS DEL  
MOTEADO CLORÓTICO DEL GIRASOL***



## INTRODUCCIÓN

Aproximadamente un tercio de la producción potencial mundial de cultivos se pierde a causa de enfermedades, insectos o malezas. Las enfermedades causadas principalmente por hongos, bacterias y virus son responsables de la merma del 14% de la producción (Agrios 2005).

En girasol, las enfermedades provocan grandes pérdidas económicas. El principal causante de dichas mermas son los hongos, sin embargo los virus constituyen un peligro potencial (Escande 2000). En Argentina desde los años 70 se han observado lotes de girasol afectados por virus (Muñoz *et al.* 1980). Si bien la incidencia en general es baja, menor al 3%. En algunos casos ha llegado a ser del 95% (Lenardon 1994). Los síntomas asociados a la infección del girasol con virus comúnmente observados consisten en mosaicos, anillos cloróticos y moteado clorótico (Pérez Fernández 2002).

Dujovny *et al.* (1998, 2000) han realizado la caracterización de un potyvirus que infecta al girasol doméstico y ruderal de Argentina, el cual denominaron *Virus del moteado clorótico del girasol*, SuCMoV. En girasol, este virus es el que presenta mayor distribución en Argentina. Ha sido reportado afectando cultivos de girasol en las provincias de Entre Ríos, Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Los síntomas que causa su infección son manchas amarillas en las hojas que terminan por producir clorosis generalizada en toda la planta y retraso del crecimiento. La infección con este virus reduce la altura de la planta, el diámetro del tallo y del capítulo, el tamaño y peso de los granos producidos. Además produce cambios en la fenología, anticipando la floración e induciendo el secado anticipado de las flores liguladas del capítulo. El SuCMoV puede causar la reducción de más del 50% del rendimiento, si la infección sucede antes de la aparición de la octava hoja en híbridos susceptibles (Lenardon *et al.* 2001). Actualmente se conocen dos cepas de este virus, la cepa de la mancha anular (Bejerman *et al.* 2008) y la cepa común (C) (Dujovny *et al.* 2000). Esta última es la más extensamente distribuida (Giolitti 2014).

El SuCMoV pertenece a la familia Potyviridae y como muchos de estos virus se transmite de planta en planta principalmente durante la acción alimentaria de un vector infectado. Además del girasol, el SuCMoV también afecta a especies de las familias Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae y Solanaceae que constituyen los

reservorios naturales del virus (Dujovny *et al.* 1998). El control de los virus es dificultoso, por lo que es conveniente utilizar variedades resistentes cuando existen, ya que es la manera más simple, económica y sustentable de manejar las posibles infestaciones naturales (Agrios 2005).

En las plantas la verdadera resistencia a una enfermedad está controlada genéticamente por uno, pocos o muchos genes y puede ser parcial o total (Agrios 2005). La resistencia total implica que el virus no puede colonizar a su hospedero, mientras que en la resistencia parcial existe colonización por el patógeno, aunque está reprimida. Generalmente, la severidad de los síntomas refleja el nivel de replicación y acumulación del virus en su hospedero (Revers *et al.* 1999).

El girasol es susceptible a la cepa común de SuCMoV (SuCMoV-C) y hasta ahora no se han observado casos de resistencia total a este patógeno. En una exploración exhaustiva de 232 líneas endocriadas de girasol tanto públicas como privadas, Lenardon *et al.* (2001) reportaron la existencia de resistencia parcial a SuCMoV-C de solo tres líneas. La mejor respuesta se observó en la línea L33, que a diferencia de las susceptibles, con moteado clorótico severo luego de la inoculación, presentó un punteado clorótico aislado. Según el autor, similar a una respuesta de hipersensibilidad. La respuesta de hipersensibilidad en las plantas es un mecanismo activo de defensa que limita la colonización del patógeno (Agrios 2005).

Las especies silvestres emparentadas con los cultivos se consideran una fuente importante de genes de resistencia a enfermedades (Agrios 2005). Al género *Helianthus* pertenecen 51 especies, entre anuales y perennes (Seiler 2012), con amplia variabilidad genética que se han utilizado con éxito en el mejoramiento del girasol. En Estados Unidos de América se estima que las especies silvestres tienen una contribución anual de 270 a 385 millones de dólares a la industria del girasol. Parte de esta contribución corresponde a la incorporación de genes de resistencia a enfermedades desde especies silvestres (Seiler 2010).

Líneas endocriadas resistentes o tolerantes a roya negra, *Plasmopara*, *Verticillium*, *Phomopsis* y *Sclerotinia* se han desarrollado a partir del aporte de genes de resistencia de especies silvestres de girasol (Bertero de Romano y Vázquez 2003; Seiler 1992, 2010). En estas especies también se han observado casos de resistencia a *Macrophomina*,

oidio, *Alternaria*, *Rhizopus* y virus, con el desarrollo de stocks genéticos a partir del cruzamiento con líneas cultivadas en algunos casos (Seiler y Jan 2010; Seiler 2012). En virus, Jan y Gulya (2006 a, b) han registrado cuatro stocks genéticos resistentes al *Virus del mosaico de girasol*, virus que pertenece al género *Potyvirus* al igual que el SuCMoV. Generados a partir del cruzamiento de plantas silvestres de *Helianthus annuus* resistentes con la línea endocriada HA89.

En una evaluación preliminar se halló que las poblaciones ruderales de *H. annuus* de Argentina, presentaron más del 20% de resistencia al SuCMoV-C. Particularmente se destacaron dos poblaciones, colectadas en la provincia de La Pampa, Colonia Barón (BAR), y en la provincia de Buenos Aires, Carhué (CAR), que presentaron más del 50% de plantas resistentes, sin síntomas, luego de la inoculación artificial con este virus (Cantamutto *et al.* 2010 b).

En 2005, comenzó la selección de plantas resistentes a SuCMoV-C de BAR y CAR con el objetivo de desarrollar germoplasma resistente a este virus. Posteriormente, plantas resistentes fueron cruzadas con la línea endocriada A10 desarrollada por el INTA Manfredi (González *et al.* 2014); y nuevos ciclos de selección de plantas resistentes culminaron en 2009-10 con el desarrollo del germoplasma segregante con resistencia a SuCMoV-C, denominado S10 (Figura 3.1).

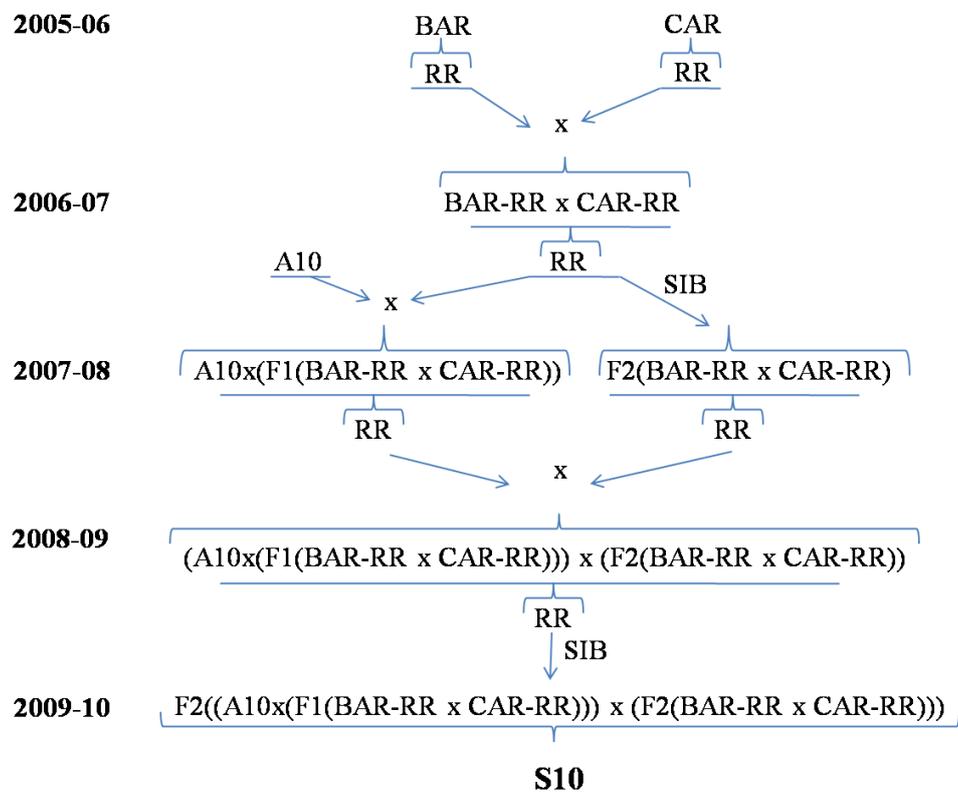
A pesar de cuatro ciclos de selección, S10 presentaba alta segregación fenotípica y falta de fijación del carácter de resistencia a SuCMoV-C. La proporción de individuos resistentes era cercana a 50%. Ello se adjudicó a que la elevada autoincompatibilidad impidió la autofecundación, por lo que la selección y el avance generacional se realizó mediante polinización controlada entre plantas hermanas (Cantamutto *et al.* 2010 a).

Las poblaciones ruderales de *H. annuus* poseen altos niveles de autoincompatibilidad. Según Presotto (2004), el nivel de autofecundación de BAR y CAR es menor a 5%. Eso se contrasta con el de las líneas endocriadas en las cuales generalmente es mayor a 40% (Miller y Fick 1997; Škorić 2012 b). En general la descendencia del cruzamiento entre los biotipos silvestre y cultivado de *H. annuus* tiene bajo nivel de autofecundación (Gandhi *et al.* 2005). Ello es adjudicado a la autoincompatibilidad esporofítica de los biotipos silvestres (Miller y Fick 1997), que se trasmite de forma dominante a la descendencia y limita fuertemente la autofecundación. Sin embargo la dominancia

genética sobre la autoincompatibilidad no es completa (Burke *et al.* 2002; Gandhi *et al.* 2005), y la autofecundación tiene un alto valor de heredabilidad (Škorić 2012 b), según Gowda y Seetharam (2008) mayor a 70%, por lo que es posible obtener semillas generadas por autofecundación en la F1 y aumentar rápidamente el nivel de autofecundación por selección en las siguientes generaciones.

Se hipotetizó que la baja frecuencia de individuos resistentes a SuCMoV-C del material segregante S10 se debía a la ausencia completa de homocigosis (Cantamutto *et al.* 2010 a). Para superar esta situación, se realizó la selección recurrente de individuos resistentes a SuCMoV-C en la descendencia de plantas autofecundas resistentes generadas a partir del cruzamiento de plantas resistentes de S10 con líneas endocriadas. El objetivo fue obtener un germoplasma con alta frecuencia de individuos resistentes a SuCMoV-C.

**Figura 3.1:** Genealogía del material segregante S10 con resistencia a SuCMoV-C. BAR: RUD de Colonia Barón. CAR: RUD de Carhué. RR: planta resistente a la inoculación con SuCMoV-C.



## MATERIALES Y MÉTODOS

La inoculación y selección por resistencia a SuCMoV-C se realizó sobre la descendencia de la población segregante con resistencia a SuCMoV-C S10 y sobre la descendencia de su cruzamiento con dos líneas endocriadas, susceptibles a SuCMoV-C (comunicación personal MSc. Daniel Álvarez, mejorador girasol INTA Manfredi); A09, androestéril con citoplasma estéril PET1, y B09, androfértil mantenedora de A09 con citoplasma *H. annuus* normal (González *et al.* 2014; Garayalde *et al.* 2015) (Figura 3.2). Se practicó la selección basada en el método genealógico (Cubero 2003), que consistió en seleccionar, reproducir y propagar la progenie de plantas resistentes separadamente, inoculando repetidamente para identificar los individuos resistentes.

El 12 de diciembre de 2009 se realizó la inoculación con SuCMoV-C sobre 42 individuos del germoplasma S10. Cuatro plantas de S10 resistentes (RR), sin síntomas de SuCMoV-C, después de la inoculación con SuCMoV-C, S10aRR, S10bRR, S10cRR y S10dRR fueron seleccionadas y trasplantadas al campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (CE-UNS). Durante el cultivo se realizó el cruzamiento de S10aRR, S10bRR, S10cRR y S10dRR con cuatro plantas de B09 y cuatro plantas de A09. Debido a la condición pluriflora y androfértil de los individuos resistentes S10 se realizó el cruzamiento recíproco entre estos y B09. En cambio A09 siempre se utilizó como parental femenino. Los capítulos con polen utilizados como hembra fueron castrados manualmente (Figura 3.2).

El 27 de noviembre de 2010 se realizó el trasplante al CE-UNS de la descendencia F1 de doce cruzamientos (A09xS10aRR), (A09xS10bRR), (A09xS10cRR), (A09xS10dRR), (B09xS10aRR), (B09xS10bRR), (B09xS10cRR), (B09xS10dRR), (S10aRRxB09), (S10bRRxB09), (S10cRRxB09) y (S10dRRxB09). Durante el cultivo se realizó la autofecundación de las plantas F1. Las F2 conformaron las poblaciones segregantes iniciales de selección por resistencia a SuCMoV-C y alto grado de autofecundación (Figura 3.2).

El 24 de noviembre de 2011 se realizó la inoculación con SuCMoV-C (n= 6-32) de la F2(B09xS10aRR), F2(B09xS10bRR), F2(A09xS10bRR), F2(S10cRRxB09), F2(B09xS10cRR), F2(A09xS10cRR) y F2(B09xS10dRR). Las restantes cruas fueron excluidas pues no produjeron semillas por autofecundación. El 22 de diciembre, 34 plantas

RR fueron trasplantadas y multiplicadas en el CE-UNS. Algunas plantas inicialmente catalogadas como RR, 24, 33, 36, 37 y 121, luego de trasplantadas al CE-UNS presentaron síntomas compatibles con la infección por SuCMoV-C moderados a severos, y fueron descartadas. Las demás plantas trasplantadas fueron reproducidas mediante autofecundación (Figura 3.2).

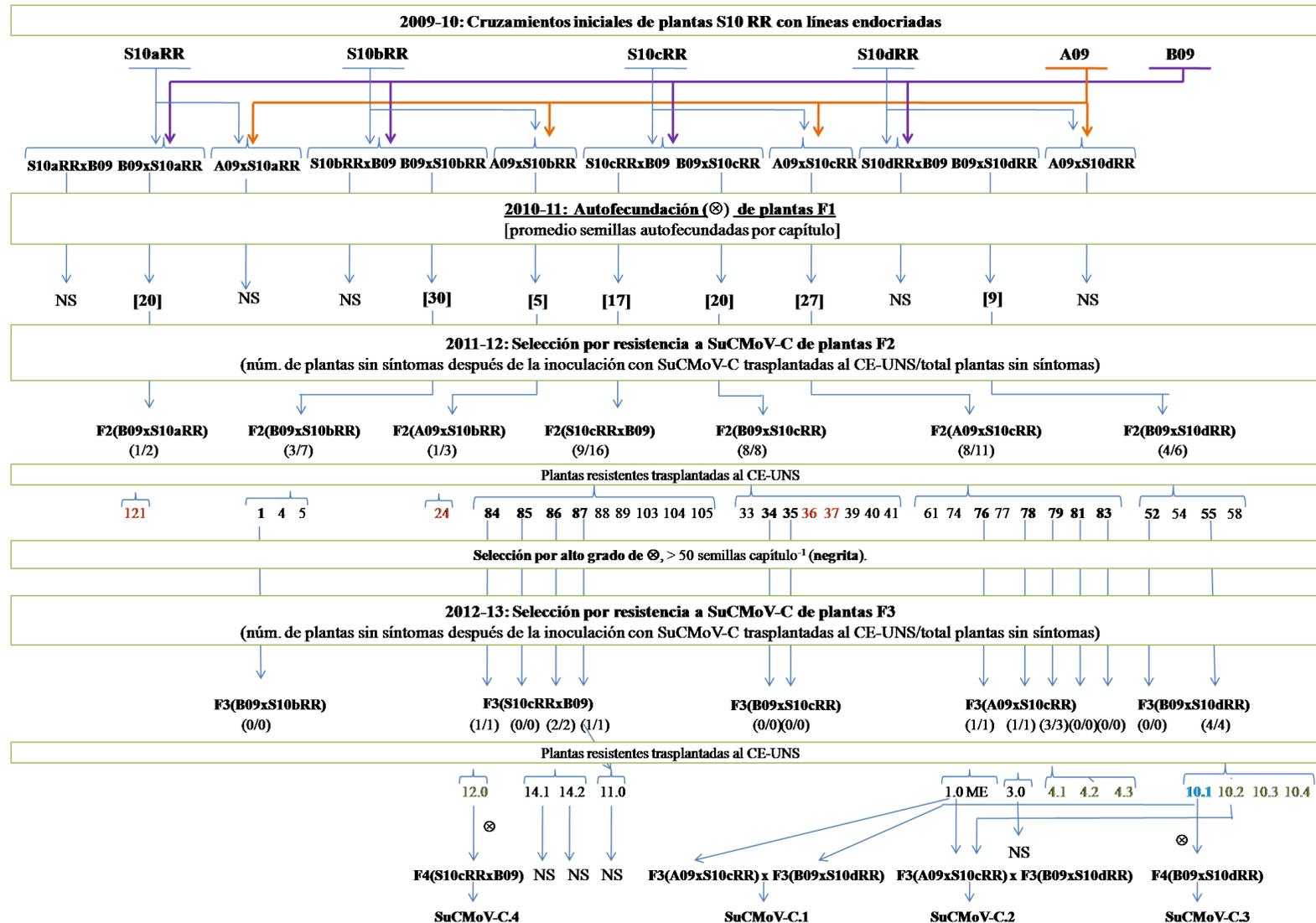
El 26 de enero de 2012 se ejecutó una nueva inoculación con SuCMoV-C sobre la descendencia (n=2-10) F3(B09xS10bRR), F3(S10cRRxB09), F3(B09xS10cRR), F3(A09xS10cRR) y F3(B09xS10dRR) proveniente de la autofecundación de plantas F2 RR con más de 50 semillas producidas por capítulo. Trece plantas F3 RR fueron trasplantadas al CE-UNS el 18 de enero de 2013. Un capítulo de una planta androestéril F3(A09xS10cRR) resistente sin síntomas de moteado en el CE-UNS, 1.0ME, fue polinizado con polen de una planta F3(B09xS10dRR) RR, 10.1, aunque con síntomas de moteado clorótico aislado muy escaso, compatible con la infección de SuCMoV-C, durante su cultivo en el CE-UNS. La descendencia de este cruzamiento fue denominada SuCMoV-C.1. Otro capítulo de 1.0ME fue polinizado con polen de otra planta F3(B09xS10dRR) catalogada como RR, 10.2, aunque con síntomas de moteado clorótico aislado escaso, compatible con la infección de SuCMoV-C, durante su cultivo en el CE-UNS. La descendencia de este cruzamiento fue denominada SuCMoV.C.2. Un capítulo de la planta 10.1 fue autofecundado, su descendencia constituyó el SuCMoV.C.3. Una planta F3(S10cRRxB09) catalogada como RR, 12.0, aunque con síntomas de moteado clorótico aislado escaso observado durante su cultivo en el CE-UNS, fue autofecundada y se denominó SuCMoV-C.4. La producción de semillas por autofecundación de SuCMoV-C.3 y SuCMoV-C.4 fue mayor a 100 semillas por capítulo (Figura 3.2).

Los capítulos utilizados para la producción de semillas fueron tapados en R4 (Schneiter y Miller 1981) con bolsas de papel o poliamida para la exclusión de insectos. La polinización se realizó con polen fresco recolectado de capítulos tapados.

Las plantas seleccionadas se trasplantaron al CE-UNS cuando estas presentaban entre 40-100 cm de altura. La separación entre parcelas fue de 100 cm y entre plantas de la misma parcela de 30 cm. Se suministró riego por goteo para abastecer la demanda de agua de las plantas en el CE-UNS.

**Figura 3.2:** Generación del stock genético resistente a la cepa común del *Virus del moteado clorótico de girasol*, SuCMoV-C, a partir del cruzamiento de cuatro plantas S10 resistentes a SuCMoV-C con la línea endocriada, A09 y su mantenedora B09.

Letra minúscula indica individuos S10 diferentes. RR: resistente, sin síntomas de SuCMoV-C luego de la inoculación. NS: sin producción de semillas. ME: androesterilidad. ⊗: autofecundación. Plantas catalogadas como resistentes que presentaron síntomas de SuCMoV-C en el CE-UNS; en rojo: infección severa (Figura 3.3a); en verde: infección moderada a escasa (Figura 3.3c); en celeste: infección escasa (moteado clorótico aislado y muy escaso). CE-UNS: campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur.



En 2013-14, se evaluó la resistencia a SuCMoV-C de los cuatro stocks genéticos generados, SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3 y SuCMoV-C.4 originados a partir de los dos ciclos de selección por resistencia a SuCMoV-C con alto grado de autofecundación (Figura 3.2). En el campo experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Manfredi, Córdoba, se sembró la descendencia de los cuatro stocks genéticos con resistencia a SuCMoV-C en grupos de 17 plantas con dos a cuatro réplicas, en un diseño de parcelas divididas.

Durante el período de selección, la inoculación con SuCMoV-C se ejecutó en el Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal, del INTA en Córdoba, Argentina. Para inducir la germinación de semillas dormantes se colocaron en bandejas plásticas sobre papel humedecido durante una semana a 4-7°C (ISTA 2004). Luego fueron sembradas de una o dos en macetas de 3 litros y cultivadas en invernáculo. Como control de inoculación se sembraron macetas con semillas del cultivar susceptible Contiflor 17 (CF17), n=19 o 20.

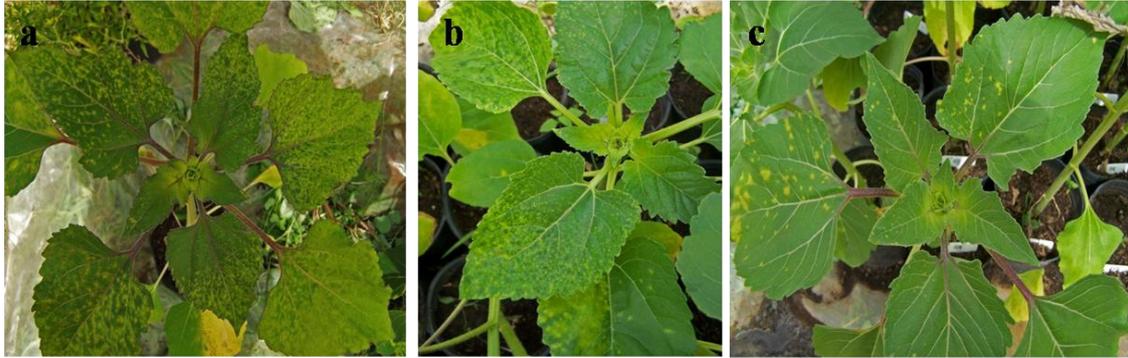
En la evaluación final la inoculación se llevo a cabo en el campo experimental del INTA Manfredi. Además de los cuatro stocks genéticos resistentes a SuCMoV-C, se dispusieron dos grupos de 17 plantas de las líneas endocriadas B09 y B10 como controles susceptibles.

Durante el período de selección y en la evaluación final, la inoculación artificial con SuCMoV-C se realizó sobre plantas individuales (n=2-41) cuando las plantas tenían entre 2-6 hojas verdaderas. Se utilizó una pistola a presión (5-8 bar) y como fuente de inóculo se usó SuCMoV-C aislado en girasol. Para preparar el inóculo hojas sistémicamente infectadas fueron maceradas en 1/10 (p/v) de solución tampón 0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7, con 0.1% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, y filtrado con gasa. Se incorporó a la suspensión carburo de silicio de granulación 600 como abrasivo, 0.25 g cada 10 ml.

La infección de las plantas con SuCMoV-C se valoró 15 días después de la inoculación. Los individuos inoculados se clasificaron en forma visual según los síntomas observados en las hojas, como susceptibles cuando el moteado clorótico era confluyente sobre toda la lámina, tolerantes cuando el moteado clorótico era moderado y como resistentes (RR) cuando no tenía síntomas visibles de la enfermedad o cuando el

moteado clorótico era muy escaso y se mantenía aislado permanentemente, asemejándose a una respuesta de hipersensibilidad (Lenardon *et al.* 2005) (Figura 3.3).

**Figura 3.3:** Plantas inoculadas con SuCMoV-C con síntomas visibles de la infección. Planta susceptible (a), tolerante (b) y resistente con punteado escaso (c).



**Susceptible**

**Tolerante**

**Resistente con punteado escaso**

## RESULTADOS

En las tres evaluaciones con inoculación artificial, los controles susceptibles CF17, B09 y B10, tuvieron 100% de infección, indicando que el mecanismo de inoculación utilizado fue efectivo (Tabla 3.1).

En general se observó un aumento de la proporción de individuos resistentes a medida que se avanzó en la genealogía de selección por resistencia a SuCMoV-C. S10 tuvo 48% de individuos resistentes. La descendencia F2 de los cruzamientos iniciales (A09xS10cRR), (B09xS10dRR) y (S10cRRxB09) tuvo 62% de individuos resistentes a SuCMoV-C, la F3 aumentó este valor 17% mientras que la descendencia F4 de (B09xS10dRR), (S10cRRxB09) y la derivada de los cruzamientos (F3(A09xS10cRR))MEx(F3(B09xS10dRR)) superó en 21% la resistencia observada en la F3 (Tabla 3.1).

Conjuntamente la descendencia F2 de los tres cruzamientos, (A09xS10cRR), (B09xS10dRR) y (S10cRRxB09), tuvo 62% de individuos resistentes, 21% de individuos tolerantes y 17% de individuos susceptibles. Este patrón de segregación general, fue observado en la segregación de la mayoría de las F2 analizadas en forma particular, en las cuales más del 70% de las plantas inoculadas con SuCMoV-C presentaron algún grado de resistencia (tolerancia o resistencia). Excepto en la descendencia F2 de la planta 3 y 11, de los cruzamientos (A09xS10cRR) y (S10cRRxB09), que presentaron una desviación con respecto a este patrón de segregación con más del 50% de los individuos inoculados susceptibles (Tabla 3.1).

En la F3 se pudieron detectar individuos susceptibles, aunque la proporción de individuos resistentes aumentó de 62% en la F2 a 79% en la F3. El análisis particular de cada una de las descendencias F3 reveló que el 60% o más de los individuos inoculados con SuCMoV-C fue resistente, salvo en la descendencia F3 (A09xS10cRR) de la planta 4-78 y 5-81 cuya proporción de individuos susceptibles fue de 50% o más (Tabla 3.1).

No se observaron individuos susceptibles o tolerantes en los individuos inoculados con SuCMoV-C de la generación F4 generada a partir de los cruzamientos (B09xS10dRR) y (S10cRRxB09) y de los dos cruzamientos (F3(A09xS10cRR)ME)x(F3(B09xS10dRR)) (Tabla 3.1).

La proporción de individuos tolerantes más resistentes aumentó de 62% en la F2 a 100% después de dos ciclos de selección por resistencia a SuCMoV-C con alto grado de autofecundación (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1:** Resultados de la inoculación con SuCMoV-C de individuos de la población segregante resistente SuCMoV-C, S10, y de su cruzamiento con las líneas domésticas, A09 y B09, durante el período de desarrollo de los stocks genéticos resistentes a SuCMoV-C: SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3 y SuCMoV-C.4. RR: resistente a SuCMoV-C. TT: tolerante a SuCMoV-C. SS: susceptible a SuCMoV-C.

Descendencia evaluada	Identificador planta madre	Reacción de la planta madre a la inoculación: RR o TT	Reacción de la descendencia a la inoculación		
			SS	TT	RR
(núm.)					
2009-10					
<b>S10</b>			22		20
<b>CF17</b>			19		0
2011-12					
	1	--	0	3	2
	2	--	0	3	1
<b>F2(A09xS10cRR)</b>	3	--	3	0	1
	4	--	1	0	4
	5	--	0	0	4
<b>F2(B09xS10dRR)</b>	6	--	0	1	3
	7	--	1	0	1
	8	--	0	0	5
	9	--	0	2	2
	10	--	0	1	1
<b>F2(S10cRRxB09)</b>	11	--	3	0	2
	12	--	0	1	3
	13	--	1	0	3
	14	--	0	2	3
	15	--	1	0	3
<b>CF17</b>			19	0	0

Continuación Tabla 3.1.

Descendencia evaluada	Identificador planta madre	Reacción de la planta madre a la inoculación: RR o TT	Reacción de la descendencia a la inoculación		
			SS	TT	RR
(núm.)					
<b>2012-13</b>					
<b>F3(A09xS10cRR)</b>	4-76	RR	0	0	7
	4-78	RR	7	0	2
	5-79	RR	2	0	5
	5-81	RR	4	0	4
	5-83	RR	0	0	2
<b>F3(B09xS10dRR)</b>	6-52	RR	2	0	8
	6-55	RR	0	0	5
<b>F3(S10cRRxB09)</b>	8-84	RR	0	0	10
	8-85	RR	1	0	9
	8-86	RR	0	0	3
	8-87	RR	0	0	6
<b>CF17</b>			20	0	0
<b>2013-2014</b>					
<b>SuCMoV-C.1</b>	4-76-1.0Mex6-55-10.1	RRxRR <sup>1</sup>	0	0	34
<b>SuCMoV-C.2</b>	4-76-1.0Mex6-55-10.2	RRxRR <sup>2</sup>	0	0	34
<b>SuCMoV-C.3</b>	6-55-10.1	RR <sup>1</sup>	0	0	68
<b>SuCMoV-C.4</b>	8-84-12.0	RR <sup>2</sup>	0	0	68
<b>B09</b>			34	0	0
<b>B10</b>			34	0	0

<sup>1</sup>: planta catalogada como resistente que luego presentó síntomas de moteado clorótico aislado muy escaso. <sup>2</sup>:. planta catalogada como resistente que luego presentó síntomas de moteado clorótico aislado escaso

## DISCUSIÓN

Plantas sanas son esenciales para obtener una performance adecuada de los cultivos. En girasol, la resistencia genética es el método más utilizado para enfrentar los problemas originados por enfermedades (Gulya *et al.* 2010). El mejoramiento genético por resistencia es económicamente y medioambientalmente más conveniente ya que elimina las pérdidas productivas derivadas de la enfermedad y disminuye la utilización de medidas de control químico en los cultivos (Agrios 2005).

La resistencia a SuCMoV-C del germoplasma S10 fue introducido con éxito al fondo genético de girasol utilizando la línea A09 y su mantenedor B09. A partir de la F2 de los tres cruzamientos realizados se observaron individuos resistentes. La línea doméstica utilizada en los cruzamientos fue 100% susceptible al SuCMoV-C. Por ello se entiende que la resistencia observada en la descendencia del cruzamiento de A09 o B09 con S10 estuvo originada en el germoplasma S10.

Después de dos ciclos de selección por resistencia a SuCMoV-C, todas las selecciones, SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3, SuCMoV-C.4, tuvieron 100% de resistencia. Con el avance generacional se observó un notable aumento del porcentaje de individuos resistentes a SuCMoV-C respecto a S10. Similares resultados fueron obtenidos por Jan y Gulya (2006 a, b) durante el desarrollo de stocks genéticos con resistencia al virus del mosaico de girasol (SuMV), a partir de material resistente silvestre de *H. annuus* estadounidense en cruzamiento con la línea HA89. El germoplasma homocigoto para este carácter se logró, en familias F4, en el primer caso, y F3, en el segundo caso, después de la selección y autofecundación de plantas resistentes con pedigree silvestre\*HA89.

Lenardon *et al.* (2005) así como Jan y Gulya (2006 b) coinciden en opinar que la resistencia a SuCMoV y a SuMV, virus de la familia *Potyviridae*, observada en sus germoplasmas estuvo controlada por un gen con acción dominante. Si bien en la mayoría de los casos, la resistencia de las plantas a los virus parece estar bajo control genético simple (Maule *et al.* 2007), existen reportes que demuestran que la resistencia también puede estar regulada mediante control oligo o poligenético (Di Renzo *et al.* 2004; Gómez *et al.* 2009, Rossi *et al.* 2015). En el presente trabajo hay evidencias de

que el control genético de la resistencia a SuCMoV-C en los stocks genéticos desarrollados podría estar gobernado por más de un gen.

En el stock genético desarrollado por resistencia a SuCMoV-C, la mayoría de las descendencias F2 y F3 analizadas por resistencia a SuCMoV-C, presentaron el 60% o más de los individuos con algún grado de resistencia, individuos tolerantes más resistentes. Sin embargo dos F2 y dos F3 de los cruzamientos realizados revirtieron este patrón de segregación, y el 50% o más de los individuos inoculados, provenientes de un parental resistente en el caso de la descendencia F3, fueron susceptibles a SuCMoV-C.

Inicialmente se podría pensar que la segregación antagónica de algunas F2 y F3 se deben a que el germoplasma S10 resistente, utilizado como parental dador del carácter de resistencia, no presentaba el carácter en homocigosis. Si un solo gen con acción dominante controlara esta característica y el parental S10 resistente heterocigota se cruzara con la línea susceptible homocigota, se esperarían dos genotipos de plantas F1, una de tipo heterocigota resistente y otra homocigota susceptible. La segregación porcentual de individuos resistentes:susceptibles en la F2 de cada una de ellas sería, en el primer caso de 75:25 y en el segundo caso 100% susceptibles (Cubero 2003). En cambio la segregación resistentes:susceptibles de la F3 de individuos F2 resistentes heterocigotas o resistentes homocigotas autofecundados sería de 75:25 o 100% resistente, respectivamente.

Ninguno de los casos observados de reversión del patrón de segregación de la F2 y la F3 coincidió con los modelos propuestos en el párrafo anterior. En estos casos la cantidad de individuos susceptibles fue mayor al 25% pero menor al 100%, ya que entre los individuos inoculados el 25-50% fue resistente. En función de estos resultados se podría pensar que la resistencia a SuCMoV-C podría estar gobernada por la acción conjunta de más de un gen.

Melchinger *et al.* (1998) observaron una situación similar a la propuesta en la segregación de algunos cruzamientos entre germoplasma de maíz resistente y susceptible al virus del mosaico de la caña de azúcar. En ellos algunas familias F3 derivadas de plantas resistentes F2, supuestamente homocigotas para el carácter de resistencia, presentaron segregación de plantas susceptibles y resistentes. Urie (1985), quien estudió el modo de herencia del carácter alto oleico en líneas mutantes de girasol,

observó una completa reversión de la dominancia del carácter alto oleico en algunas familias F2 a partir del cruzamiento de una línea mutante alto oleico con una línea tradicional, reducido contenido de ácido oleico. En función de sus resultados ambos autores sugirieron que el carácter en estudio, resistencia o alto oleico, estaba gobernado por más de un gen.

Si bien parece una alternativa plausible que la resistencia a SuCMoV-C esté gobernada por más de un gen, estos resultados solo deben considerarse como preliminares ya que solo se consideró el análisis de descendencia F2 y F3, cada una con reducida cantidad de individuos inoculados (2-10), debido a lo cual no se determinó el modelo de segregación estadísticamente. Además se debe considerar que la resistencia a enfermedades en muchos casos es compleja, muchas veces de carácter poligénica (Poormohammad Kiani y Sarrafi 2010).

Los stocks genéticos SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3 y SuCMoV-C.4 fueron depositadas en el Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi, registrados bajo la denominación CGGI1351, CGGI1352, CGGI1353 y CGGI1354, respectivamente.

## **CONCLUSIONES**

A partir de la hipótesis y objetivo de trabajo planteados emergen las siguientes conclusiones:

El cruzamiento de plantas resistentes S10 con las líneas endocriadas A09 y B09, y la selección conjunta por resistencia a SuCMoV-C y alto grado de autofecundación de la descendencia de los cruzamientos condujo a la generación de cuatro germoplasmas resistentes a SuCMoV-C (SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3 y SuCMoV-C.4) sin segregación fenotípica para el carácter de resistencia.

# **CAPÍTULO 4:**

**DIAMANTE, POBLACIÓN RUDERAL *Helianthus annuus*, RECURSO GENÉTICO POTENCIAL PARA LA MEJORA DE LA CALIDAD DEL ACEITE DE GIRASOL**



## INTRODUCCIÓN

El girasol se encuentra actualmente en el cuarto lugar entre los aceites vegetales más consumidos (Calzada 2014). El principal destino del aceite de girasol es la alimentación humana, tanto a nivel doméstico como industrial, debido a su especial composición lipídica, de olor y sabor agradable que no se modifican con la cocción (Burton *et al.* 2004; Fernández Martínez *et al.* 2007). En menor proporción, también es utilizado en la industria de fabricación de pinturas, barnices, plásticos, detergente, jabón y para elaborar biodiesel (López Pereira *et al.* 2006).

Sus usos y propiedades nutricionales e industriales están determinados por la composición de ácidos grasos en el aceite y los niveles de tocoferoles, carotenoides y otros compuestos (Kaya *et al.* 2012). El consumo de grasas y aceites en el mundo ha ido evolucionando. Más recientemente, la necesidad del cuidado de la salud a través de una mejor alimentación y de la industria alimenticia de aceites para usos específicos empezó a demandar aceites con calidades específicas en función de su destino. Es así que la conformación del aceite de girasol se ha ido adaptando a las necesidades del mundo (Fernández Martínez *et al.* 2007).

Los híbridos actuales de girasol pueden producir entre 420-550 g de aceite por cada kg de grano procesado (López Pereira *et al.* 2006). El aceite extraído representa el 80% del valor total del cultivo. Los híbridos que tienen una composición tradicional de aceite presentan mayoritariamente ácidos grasos insaturados, principalmente ácido linoleico (48-74%) y en segundo lugar ácido oleico (14-40%). Mientras que entre el 5-11% del aceite se compone de ácidos grasos saturados, principalmente ácido palmítico y esteárico (Fernández Martínez *et al.* 2007; Bervillé 2010). Este tipo de aceite principalmente poliinsaturado es deseable desde el punto de vista nutricional y de la salud, ya que el ácido linoleico es un ácido graso esencial para los humanos, además contribuye a prevenir enfermedades cardíacas relacionadas con el aumento de la concentración sanguínea de colesterol (FAO y FINUT 2012). Sin embargo, para la industria de las frituras es poco deseable ya que los ácidos poliinsaturados son poco estables a temperaturas elevadas y se oxidan fácilmente. Este tipo de industrias requiere aceites vegetales con alto contenido de ácido oleico y antioxidantes, como los tocoferoles. Para abastecer esta demanda se desarrolló el aceite de girasol medio y alto oleico, que contiene más del 50% de este ácido graso monoinsaturado en su

composición lipídica (Melgarejo 2003; Burton *et al.* 2004; Bervillé 2010). La calidad especial de este aceite le confiere alto punto de ebullición y buena estabilidad oxidativa, características fundamentales para esta industria alimenticia (López Pereira *et al.* 2006).

Las grasas saturadas, especialmente las que contienen elevadas proporciones de ácido palmítico, son indeseables para el consumo humano ya que causan un efecto detrimental sobre la generación de colesterol, comparadamente con los aceites en los que predominan los ácidos grasos mono y poliinsaturados. En la industria alimenticia las grasas saturadas son necesarias para la elaboración de ciertos productos como la margarina. Si los ácidos grasos saturados no están presentes, se requiere hidrogenar los ácidos grasos insaturados para obtener aceites sólidos a temperatura ambiente. Este proceso tiene como contrapartida la generación de isómeros *trans*, los cuales aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares (FAO y FINUT 2012). Para minimizar la hidrogenación de los aceites se han desarrollado cultivares con alto contenido de ácidos grasos saturados (Fernández Martínez *et al.* 2006).

La caracterización cuantitativa y cualitativa del perfil ácido en los aceites vegetales se realiza principalmente mediante las técnicas de cromatografía líquida de alta presión y cromatografía gaseosa de alta resolución debido a su alta sensibilidad y exactitud (Gromadzka y Wardencki 2011). La determinación de la calidad del aceite puede hacerse tanto en un grupo de granos como en un grano individual. El desarrollo de estas técnicas permitieron el mejoramiento genético de la calidad de aceite de los cultivos oleaginosos (Downey y Harvey 1963; Fernández Martínez *et al.* 2007).

En el mejoramiento de la calidad del aceite de girasol se ha utilizado con éxito la evaluación de germoplasma, recombinación y mutagénesis inducida (Fernández Martínez *et al.* 2007). Las líneas mutantes permitieron determinar la herencia del carácter modificado. La mayoría de los estudios concuerdan en que la síntesis de ácidos grasos en el aceite de los embriones de girasol están gobernados por una pequeña cantidad de genes. El aumento de la síntesis de ácido palmítico y esteárico parece estar gobernado por tres y dos genes recesivos, respectivamente (Pérez Vich *et al.* 1999 a, b; 2002 a, b; 2004). Mientras que la disminución de la síntesis de éstos ácidos grasos parece estar gobernada por la acción aditiva (Miller y Vick 1999) o dominante (Vick *et al.* 2002). El carácter alto oleico parece estar controlado por al menos tres genes. La mayoría de los autores concuerdan en que un gen principal es el responsable de esta

característica, que en la mayoría de la bibliografía se presenta como dominante, el cual está acompañado de otros genes que actúan directamente sobre la síntesis de este ácido graso pero con un efecto de menor magnitud (Urie 1985; Miller *et al.* 1987; Fernández Martínez *et al.* 1989; Pérez Vich *et al.* 2002 a). Se ha observado dominancia, aditividad y recesividad en el control genético del carácter alto linoleico (Simpson *et al.* 1989; Šcorić 2012 b).

El modo de acción de los genes que controlan la síntesis de los ácidos grasos que componen el aceite de las semillas no es siempre constante. En algunos cruzamientos entre líneas alto oleico con líneas tradicionales se ha observado una reversión del efecto de dominancia del gen alto oleico en parte de la descendencia. Ello fue justificado por la presencia de genes modificadores y una falta de homogeneidad para el carácter en la línea tradicional (Urie 1985; Fernández Martínez *et al.* 1989). La reversión en la F3, del efecto de dominancia hacia menor síntesis de ácido esteárico observado en la F2, fue descrito por Pérez Vich *et al.* (2004). Este suceso se debió al ligamiento entre el gen que controlaba el carácter alto esteárico y el gen que controlaba el carácter de fertilidad, ya que solo la F2 androfértil del cruzamiento de la línea con androesterilidad nuclear P21 con la línea fértil alto esteárico CAS 14 produjeron semillas. En cártamo (*Carthamus tinctorius*), que como el girasol es de la familia Asteracea, Carapetian y Knowles (1993) observaron ligamiento entre el carácter de androesterilidad y la síntesis de ácido oleico. Ello modificó la herencia del contenido de estos ácidos grasos en la descendencia del cruzamiento entre líneas alto oleico con tradicionales. Las plantas F2 fértiles presentaron mayor contenido de ácidos grasos insaturados que las estériles.

Una fuente amplia de variabilidad genética para el mejoramiento de la calidad de aceite de girasol son las especies silvestres del mismo complejo taxonómico. La variabilidad genética también es importante en los programas de mutagénesis ya que el *background* genético del material inicial condiciona el éxito del mismo. Existen líneas en las que la composición acídica nunca ha podido ser modificada mediante mutagénesis (Fernández Martínez *et al.* 1997).

Thompson *et al.* (1981), Seiler (2007, 2015) y, Seiler y Jan (2010) han destacado la importancia de las especies silvestres del género *Helianthus* como portadoras de perfiles acídicos peculiares, que podrían ampliar la estrecha variabilidad del girasol. Algunas especies silvestres de América del Norte presentan características de interés, como alto

contenido de ácido linoleico en *H. petiolaris*, *H. anomalus*, *H. porteri*; alto palmítico en *H. paradoxus*, *H. argophyllus*, *H. annuus* y *H. praecox*, y baja proporción de saturados en *H. porteri*.

Cantamutto *et al.* (2008 b) evaluaron la composición acídica de los granos de siete poblaciones espontáneas de *H. annuus* en Argentina. El perfil acídico de una población localizada en la barranca del río Diamante en Entre Ríos (DIA), se distinguió por la mayor proporción de ácidos grasos saturados, ácido linoleico y menor contenido de ácido oleico.

Las particularidades en el perfil acídico de DIA fueron el punta pié inicial para este trabajo, en el cual se planteó la siguiente hipótesis y objetivo:

Hipótesis: Las particularidades del perfil acídico de los granos de DIA son debidas a la expresión genética y se expresarán en la descendencia de sus cruzas controladas con líneas endocriadas de girasol.

Objetivo: Evaluar la composición de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico del aceite de granos de la progenie del cruzamiento entre DIA y líneas endocriadas de girasol.

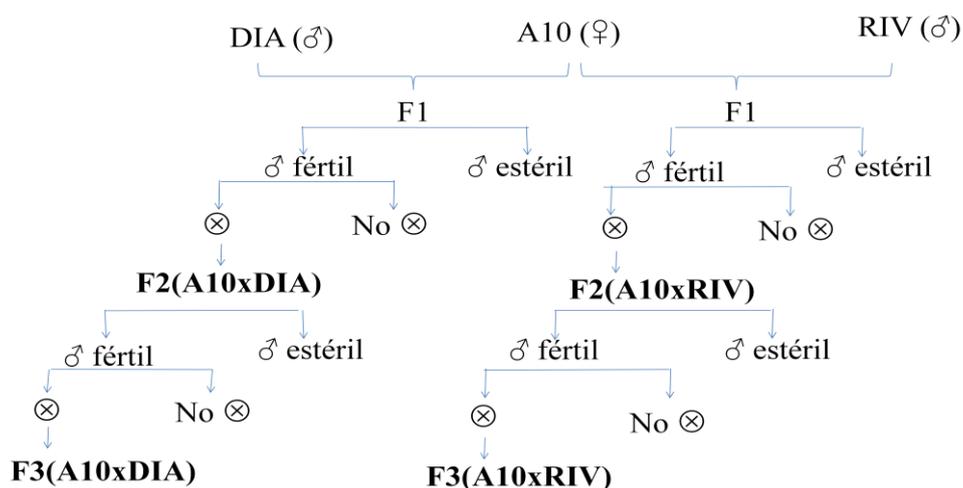
## MATERIALES Y MÉTODOS

En la evaluación de DIA como potencial recurso genético para la mejora de la calidad de aceite de girasol se realizó la determinación del contenido de ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2), primero en forma masal y luego en granos individuales de la descendencia derivada del cruzamiento entre DIA y líneas endocriadas.

### Evaluación de la variabilidad del perfil ácido a nivel masal

Se determinó el perfil ácido de granos de las poblaciones RUD DIA, RIV, la descendencia autofecundada de la F1 (F2) y de la F2 (F3) del cruzamiento entre la línea endocriada A10 con DIA y RIV (Figura 4.1), y la línea endocriada B10 (isolínea androfértil y mantenedora de A10), desarrolladas por el INTA Manfredi, Córdoba (González *et al.* 2014).

**Figura 4.1:** Generación de granos F2 y F3 a partir del cruzamiento entre A10, DIA y RIV. ♀: parentales u órganos femeninos. ♂: parentales u órganos masculinos. ⊗: autofecundación.



La generación de los granos para analizar se realizó en un jardín común durante la primavera-verano de 2009-10, en el mismo ambiente materno (Wulff 1995), mediante polinización controlada en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (S 38° 41' 38'' W 62° 14' 53'').

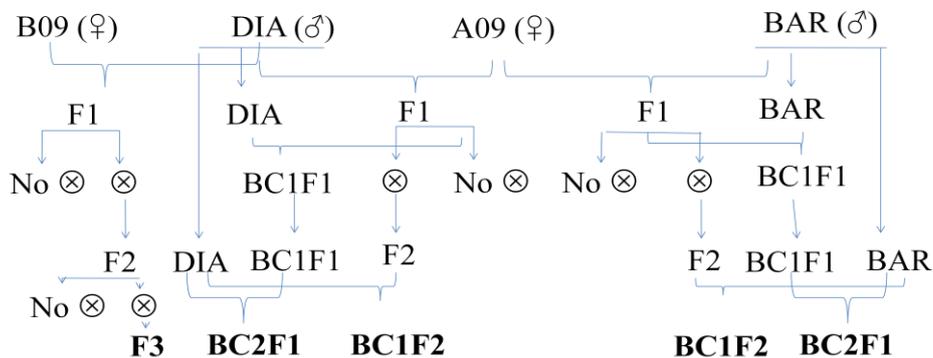
Semillas de DIA, RIV y la descendencia de los cruzamientos, fueron estratificadas una semana a 4-7°C (ISTA 2004) para inducir la germinación de semillas dormantes. Luego las semillas estratificadas de DIA, RIV, F1, F2 de ambos cruzamientos y B10 fueron colocadas en bandejas plásticas sobre papel humedecido para inducir la germinación. Las semillas germinadas fueron colocadas en bandejas multiceldas (marca, modelo: ING. CARIUCCIO, MOD 128) rellenas con sustrato MULTIPRO® de Terrafertil, compuesto por turba de musgo Sphagnum de fibra media y fina, vermiculita, cal calcita, cal dolomita, agentes humectantes y fertilizante. Plantas, criadas en invernáculo desde su germinación, con 2-3 pares de hojas fueron trasplantadas en grupos de 10 a 30 individuos por parcela. Una parcela de cada material vegetal fue dispuesta al azar en cuatro macroparcels. En cada parcela, los granos utilizados para el análisis del perfil ácido de DIA y RIV se obtuvieron de 3-5 capítulos de 20-30 plantas, tapados en R4 con bolsas para exclusión de insectos, polinizados entre hermanos de forma controlada. En cambio la generación de granos de B10, F2 y F3, se realizó forzando la autofecundación mediante el tapado del capítulo principal con bolsas para exclusión de insectos en R4 (Schneiter y Miller 1981). En B10, 3-5 plantas intervinieron en la multiplicación de semillas, mientras que la cantidad de plantas con capítulos tapados fue de 20-30 para producir granos F2 y F3. Riego por goteo se suministró para abastecer la demanda de agua de las plantas. Los capítulos fueron cosechados en R9 y luego trillados.

La composición de ácidos grasos del aceite seminal se realizó sobre un conjunto, al azar, de 30-50 g de granos. El análisis se realizó en el laboratorio del INTA Manfredi por el método aprobado por la American Oil Chemists' Society (AOCS 1998; Ac3-44) mediante la extracción con solvente n-hexano. El perfil ácido se determinó con cromatografía gaseosa (Hewlett Packard 6890, Wilmington, DE) equipado con un detector de ionización en flama y utilizando una columna capilar HP-INNOWAX (Crosslinked Polyethylene Glycol) con un film de 0.32 mm × 30 m y 0.5 µm de grosor.

### Evaluación de la variabilidad del perfil ácido en granos individuales

Se determinó el perfil ácido por grano en la descendencia F3 del cruzamiento de B09, emasculada manualmente, con DIA y los retrocruzamientos BC1F2 y BC2F1, recurrentes con DIA y BAR, generados a partir de su cruzamiento con A09 (Figura 4.2). La F3 fue generada mediante la cruce de una línea endocriada androfértil en vez de una línea androestéril para evitar la producción de plantas estériles producto de una falta de restauración de la fertilidad en la F1 o de la segregación del carácter en la F2. Los retrocruzamientos con DIA fueron generados para incrementar la fracción genómica de DIA en los granos analizados, debido a un posible control genético recesivo del contenido de algunos ácidos grasos del aceite de DIA.

**Figura 4.2:** Generación de granos F3, BC2F1, BC1F2 a partir del cruzamiento entre DIA o BAR y A09 o B09. ♀: parentales femeninos. ♂: parentales masculinos. ⊗: autofecundación.



La muestra de granos utilizada fue generada en un jardín común en 2011-12, en el mismo ambiente materno (Wulff 1995). Para ello se taparon capítulos de 10-15 plantas en R4 con bolsas para exclusión de insectos. Los granos F3 se generaron forzando la autofecundación de plantas F1 y F2. Mientras que los de los retrocruzamientos se produjeron polinizando flores (emasculadas o androestériles) de plantas F2 o BC1F1 con DIA o BAR (Figura 4.2). Los capítulos fueron cosechados en R9 y luego trillados. El contenido de ácidos grasos se determinó individualmente en 96 individuos de cada cruzamiento. La identificación individual de los perfiles ácidos se realizó por cromatografía gaseosa, en el Laboratorio de Mejora Genética Vegetal (Córdoba,

España), mediante la técnica de la media semilla que utiliza solo una parte de los cotiledones del grano para determinar la composición acídica manteniendo vivo el embrión y su capacidad germinativa (Conte *et al.* 1989; Velasco *et al.* 2008).

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa InfoStat (actualización 2013).

Mediante la representación gráfica de los residuales en el QQ-plot, obtenidos al realizar el análisis de la varianza (ANOVA), se determinó la normalidad de los datos. La disimilitud de los materiales vegetales evaluados produjo que las varianzas fueran heterocedásticas, por ello el ANOVA se realizó con la aplicación de Modelos Lineales Mixtos de InfoStat, en vinculación con la plataforma estadística R (Di Rienzo *et al.* 2012). Las medias fueron comparadas con el test LSD de Fisher.

## RESULTADOS

### Evaluación de la variabilidad del perfil ácido a nivel masal

El mayor contenido de ácidos grasos saturados (C16:0+C18:0) se observó en DIA, que alcanzó 100,1 g/kg de aceite. DIA tuvo mayor contenido de C16:0 que RIV, mientras que el contenido de C18:0 superó al observado en RIV y B10 (Tabla 4.1).

Sin embargo en la descendencia F2(A10xDIA) el contenido de C16:0 y C18:0 fue menor a los observados en DIA y que el valor medio entre los parentales (Figura 4.3).

En la F3(A10xDIA) el contenido de C16:0 fue 2,5 g/kg mayor que en la F2(A10xDIA). Este pequeño aumento causó que el contenido de este ácido graso en la F3(A10xDIA) fuese similar al contenido que presentó DIA y mayor al valor medio entre los parentales, contrariamente a lo observado en la F2(A10xDIA). En cambio el contenido de C18:0 disminuyó 2 g/kg; y a diferencia de lo observado con el contenido de C16:0, el contenido de C18:0 en la F3(A10xDIA) y en la F2(A10xDIA) fueron similares entre sí y con B10, el padre de menor valor. La variación porcentual en el contenido de C16:0 y C18:0 en la F3(A10xDIA) respecto de la F2(A10xDIA) fue cercana a 5% (Figura 4.3).

En la F2(A10xRIV) y F3(A10xRIV) el contenido de C16:0 y C18:0 fue menor a la media entre los parentales, aunque no se observaron diferencias estadísticas entre los parentales y/o la descendencia (Figura 4.3).

La descendencia de los cruzamientos con DIA presentó mayor contenido de C16:0, 8,3% más, que la descendencia de los cruzamientos con RIV. En cambio el contenido de C18:0 fue similar en la descendencia de ambos cruzamientos (Figura 4.3).

El mayor contenido de ácidos grasos insaturados, 899,8 g/kg de aceite, se observó en RIV. En cambio DIA presentó el menor contenido, 886,2 g/kg. El contenido de C18:1 fue menor en DIA, 154,7 g/kg, que en RIV y B10. En cambio B10 presentó menor contenido de C18:2, 663,3 g/kg, que RIV y DIA (Tabla 4.1).

El contenido de C18:1 de la F2(A10xDIA) fue distinto a ambos parentales, aunque menor que la media entre los mismos, 16,5 g/kg menor. En cambio el contenido de C18:2 en esta descendencia fue mayor a la media entre los parentales, 23,8 g/kg más, estadísticamente similar al contenido de DIA, parental de mayor valor (Figura 4.3).

En cambio, en la F3(A10xDIA) el contenido de C18:1 fue mayor, 43 g/kg, y el de C18:2 fue menor, 47,5 g/kg, al observado en la F2(A10xDIA), que representó una variación porcentual de 24,5 y 6,6%, respectivamente. Los cambios de la composición lipídica en la F3(A10xDIA) causaron que el contenido de C18:1 fuese mayor y el de C18:2 menor que la media entre sus parentales, con un perfil de ácidos grasos insaturados más similar a la línea B10 que a DIA. Este efecto fue contrario al observado en la F2(A10xDIA) (Figura 4.3).

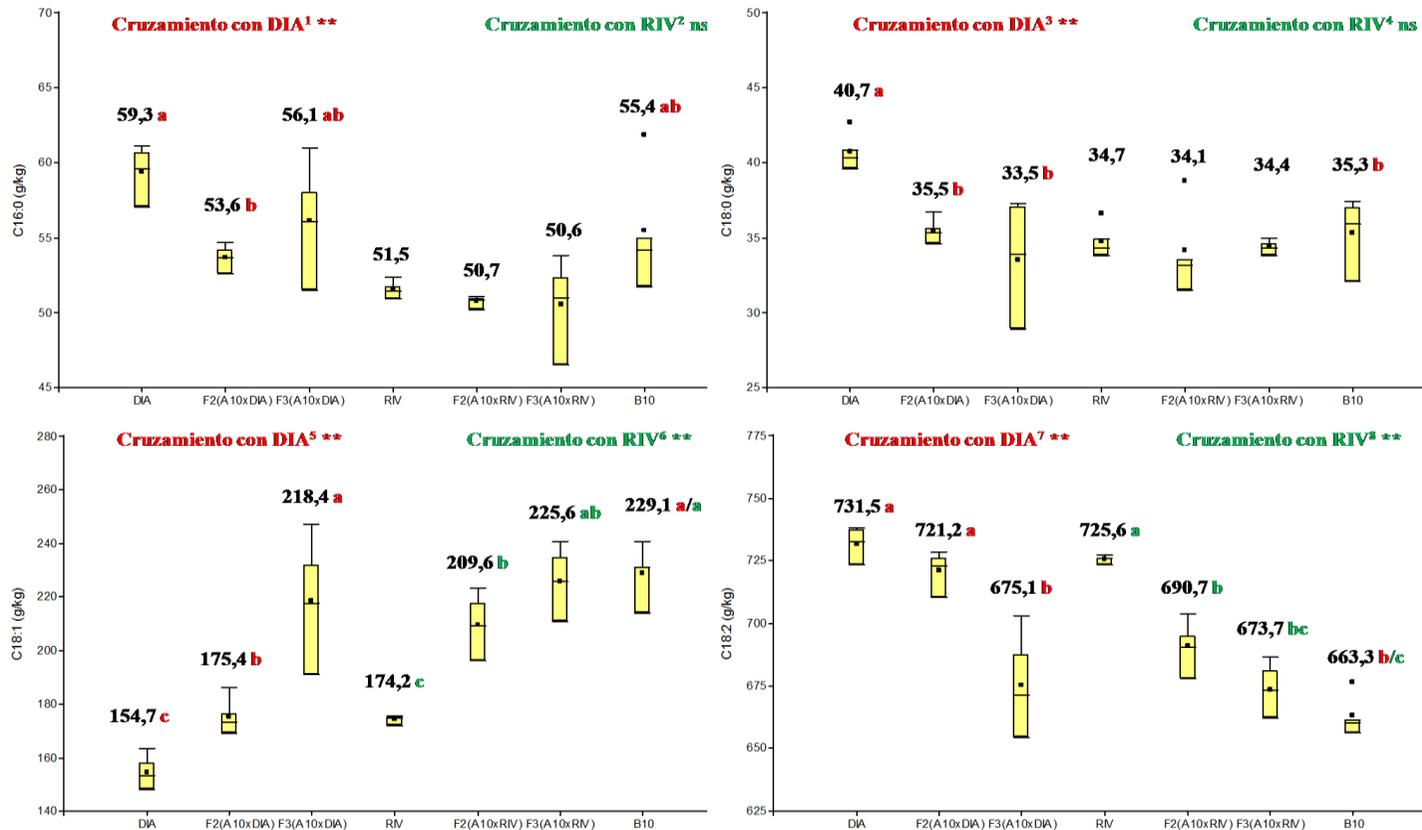
En la F2(A10xRIV), el contenido de C18:1 y C18:2 fue estadísticamente distinto a los parentales. A diferencia del cruzamiento con DIA, esta F2 tuvo un contenido de C18:1 levemente superior a la media entre los padres, 7,9 g/kg más, mientras que el contenido de C18:2 fue levemente inferior, 3,7 g/kg menos. Al igual que la F3(A10xDIA), el contenido de C18:1 y C18:2 en la F3(A10xRIV) fue más parecido a B10 de lo que lo fue la F2(A10xRIV). Aunque la variación porcentual de la F3(A10xRIV) respecto de la F2(A10xRIV) fue inferior, menor al 8%, a la observada entre la descendencia de los cruzamientos con DIA (Figura 4.3).

**Tabla 4.1:** Contenido medio de ácidos grasos saturados e insaturados en el aceite de granos de DIA, RIV y B10. C16:0= ácido palmítico. C18:0= ácido esteárico. C16:0+C18:0= ácido palmítico más esteárico. C18:1= ácido oleico. C18:2= ácido linoleico. C18:1+C18:2= ácido oleico más linoleico.

Material vegetal	Ácidos grasos saturados			Ácidos grasos insaturados		
	C16:0	C18:0	C16:0+C18:0	C18:1	C18:2	C18:1+C18:2
	<b>g/kg</b>					
<b>DIA</b>	59,4a	40,7 a	100,1 a	154,7 c	731,5 a	886,2 c
<b>RIV</b>	51,5 b	34,8 b	86,3 c	174,3 b	725,6 a	899,8 a
<b>B10</b>	55,5 ab	35,3 b	90,8 b	229,1 a	663,3 b	892,4 b
<b>ANOVA</b>	**	**	**	**	**	**

ANOVA: P-valor: altamente significativo  $p < 0,01$  (\*\*). Letras diferentes indican diferencias estadísticas,  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.

**Figura 4.3:** Contenido (g/kg) de ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) en el aceite de granos de DIA, F2(A10xDIA), F3(A10xDIA), RIV, F2(A10xRIV), F3(A10xRIV) y B10.



1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8: ANOVA con Modelos Lineales Mixtos aplicando el modelo varIdent para corregir la falta de homogeneidad de las varianzas. P-valor:  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*), sin diferencias estadísticas  $p > 0,05$  (ns). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los padres, la F2 y F3 del cruzamiento con DIA (letras rojas) y del cruzamiento con RIV (letras verdes),  $p < 0,05$  según test LSD Fisher.

### **Evaluación de la variabilidad del perfil ácido en granos individuales**

En los retrocruzamientos con DIA se observó mayor variabilidad en la composición ácida que cuando se hicieron con BAR (Tabla 4.2).

La cantidad de C16:0 de la F3 y los retrocruzamientos con DIA y BAR fluctuó entre 35 y 88 g/kg de aceite. En los retrocruzamientos con DIA la cantidad máxima de este ácido graso (88 g/kg) fue mayor a la observada en los retrocruzamientos con BAR (72 g/kg) (Tabla 4.2).

El cruzamiento recurrente con DIA produjo un aumento de la concentración de C16:0 en el aceite de los granos. El BC1F2 y el BC2F1 tuvieron, respectivamente, 5,3 g/kg y 8,7 g/kg más de C16:0 que la F3, representando un aumento de 9,6 y 15,8%, respectivamente (Tabla 4.2). La cantidad de individuos con más de 65 g/kg de C16:0 aumentó de seis en la F3 a 24 en el BC1F2 y a 41 en el BC2F1 (Figura 4.4 a).

El mayor valor de C16:0, 87,6 g/kg de aceite, y de C18:0, 73,4 g/kg de aceite, se observó en el BC1F2 del cruzamiento con DIA (Tabla 4.2). Sin embargo ningún individuo del BC1F2 exhibió conjuntamente estos valores de ácido palmítico y esteárico, tampoco en los demás cruzamientos con DIA. El valor más alto de estos dos ácidos grasos saturados obtenidos juntamente, 131 g/kg de aceite, se observó en un individuo del BC2F1 (Figura 4.4 c), el cual se ubicó en el cuadrante II de la figura 4.5, junto con aquellos individuos que presentaron una composición de C16:0 y C18:0 mayor a la media observada en los girasoles tradicionales.

En los cruzamientos generados la cantidad de C18:0 fluctuó entre 13 y 73 g/kg de aceite. En los retrocruzamientos con DIA se observaron individuos con mayor cantidad de C18:0 (73 g/kg) que en los retrocruzamientos con BAR (57 g/kg). El BC2F1 del cruzamiento con DIA tuvo 6,1 g/kg de aceite más de este ácido graso que la F3, que representó un aumento de 11,9%, mientras que el BC1F2 tuvo un valor similar a la F3 (Tabla 4.2). La cantidad de individuos con más de 45 g/kg de C18:0 en el BC2F1 aumentó 50% (Figura 4.4 b).

Se destacó un individuo del BC1F2 del cruzamiento con DIA por poseer 534 g/kg de C18:1, que es relativamente elevado considerando que B09 no posee el carácter alto

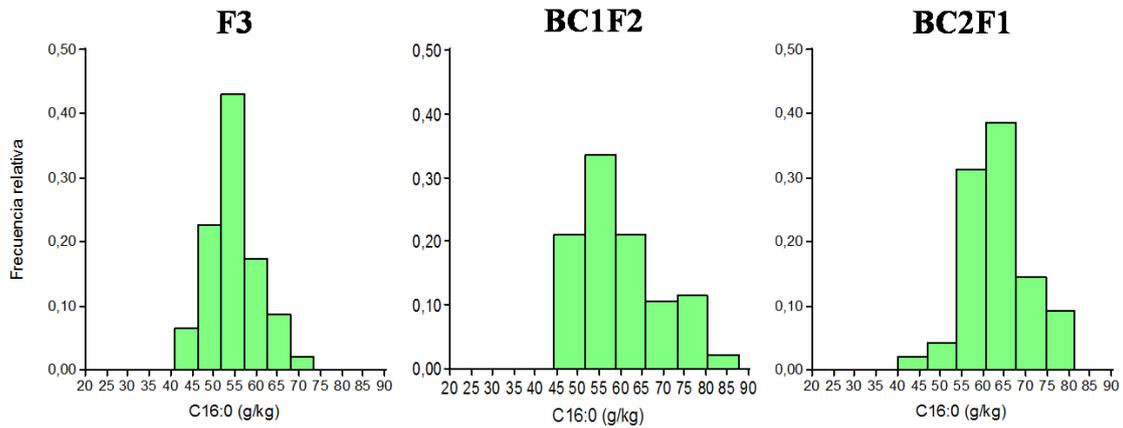
oleico. Además en la F3 de este cruzamiento se observó un individuo con más de 780 g/kg de C18:2 (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2:** Contenido medio (Med.), máximo (Máx.) y mínimo (Mín.), y coeficiente de variación (CV) del ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) en el aceite de granos individuales de la F3, el BC1F2 y el BC2F1 generados a partir de los cruzamientos de la línea A09 o B09 con DIA y BAR.

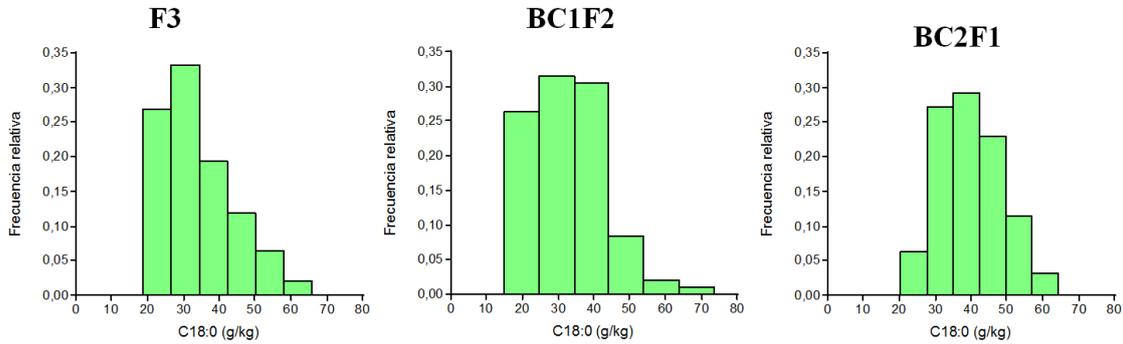
Ácidos grasos		Cruzamientos				
		Con DIA			Con BAR	
		F3	BC1F2	BC2F1	BC1F2	BC2F1
<b>C16:0</b>	Med.	54,9	60,2	63,6	53,7	47,0
	Mín. (g/kg)	40,9	44,5	40,0	42,0	35,3
	Máx.	73,5	87,6	81,5	71,8	58,9
	CV (%)	10,8	16,6	12,2	11,1	10,3
<b>C18:0</b>	Med.	34,0	32,4	40,1	27,4	26,0
	Mín. (g/kg)	18,7	15,0	20,4	13,8	15,8
	Máx.	65,9	73,4	64,3	57,4	35,9
	CV (%)	30,0	33,05	21,7	30,8	17,3
<b>C18:1</b>	Med.	309,4	401,0	266,3	242,9	253,8
	Mín. (g/kg)	140,0	227,8	158,0	165,7	177,4
	Máx.	487,7	533,8	414,8	345,1	395,0
	CV (%)	24,6	15,2	24,8	14,4	19,8
<b>C18:2</b>	Med.	601,6	505,6	629,9	675,9	673,0
	Mín. (g/kg)	429,9	363,1	477,2	560,5	523,4
	Máx.	784,4	666,6	764,6	757,2	751,8
	CV (%)	13,0	12,1	10,8	5,4	7,5

**Figura 4.4:** Histograma del contenido de (a) ácido palmítico (C16:0), (b) ácido esteárico (C18:0) y (c) del contenido de ácido palmítico más esteárico (C16:0+C18:0) en el aceite de granos individuales de la F3, el BC1F2 y el BC2F1 generados a partir del cruzamiento de A09 o B09 con DIA.

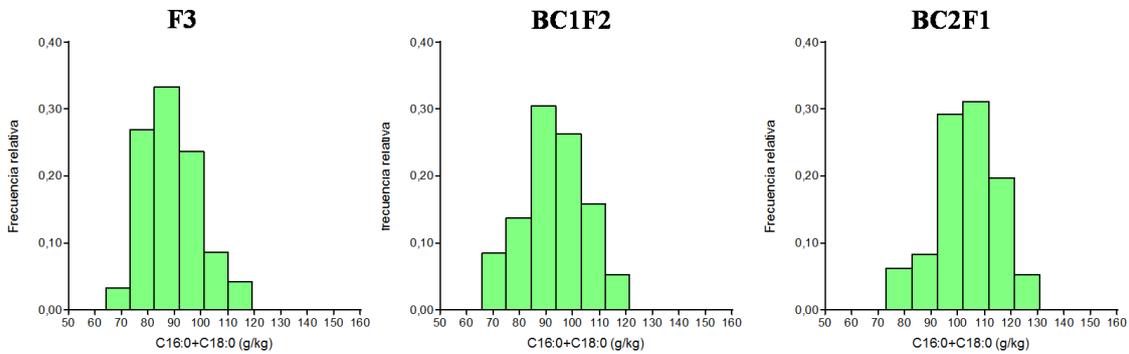
a)



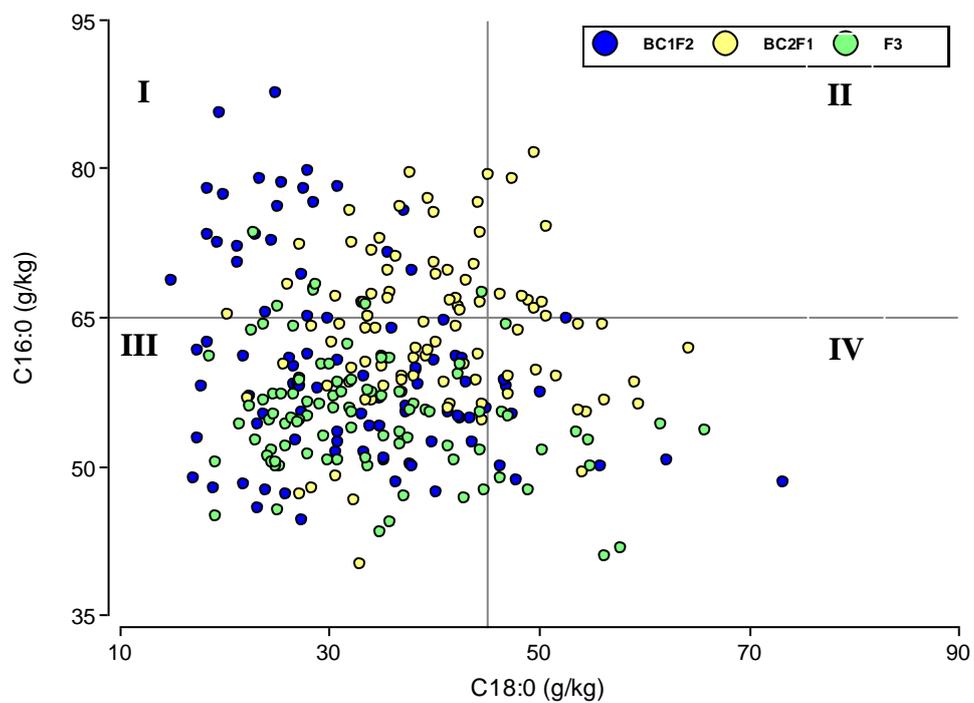
b)



c)



**Figura 4.5:** Contenido de ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) en granos individuales de la F3, el BC1F2 y el BC2F1 derivados del cruzamiento entre A09 o B09 y DIA. La línea gris perpendicular a la abscisa representa el contenido medio de ácido esteárico del girasol cultivado, mientras que el contenido medio de ácido palmítico (Bervillé 2010) está representado por una línea perpendicular a la ordenada.



## DISCUSIÓN

La calidad del aceite de girasol no solo depende del porcentaje de aceite del grano, sino también de las propiedades físicas y químicas del aceite que definen su uso (López Pereira *et al.* 2006). Cada vez más las industrias demandan aceites con una combinación especial de ácidos grasos para elaborar manufacturas que satisfagan las necesidades de los consumidores (Fernández Martínez *et al.* 2007).

DIA se caracterizó por presentar mayor variabilidad que RIV y BAR en la composición ácida de los cuatro ácidos grasos principales del aceite de sus frutos. La descendencia de los cruzamientos de DIA con líneas endocriadas, tanto en el análisis del perfil ácido de las cipselas a nivel masal como individual, presentaron en general mayor variabilidad que los cruzamientos con RIV o BAR. Cantamutto *et al.* (2008 a, b) habían observado que DIA era la población naturalizada en Argentina con rasgos distintivos en su perfil ácido. Una amplia variabilidad genética es un requisito fundamental para los programas de mejoramiento en los cuales se quiere obtener material con características novedosas (Cubero 2003).

El perfil ácido de DIA se caracterizó por poseer relativamente elevada concentración de ácido palmítico, esteárico y linoleico, y baja de ácido oleico, similar a lo observado por Cantamutto *et al.* (2008 a, b). Aunque el perfil ácido de DIA se encuentra dentro del rango de valores observados para las especies silvestres emparentadas (Seiler y Jan 2010; Seiler 2012), este material genético es de origen nacional y forma parte de la colección del Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi. A través de ese Banco, se encuentra fácilmente disponible para la utilización en programas de mejoramiento.

En el análisis de embriones individuales, los retrocruzamientos con DIA aumentaron el contenido de ácido palmítico y esteárico en el aceite de la descendencia, a diferencia de lo observado con BAR, lo que demostró el valor de DIA como fuente de estos atributos. Sin embargo el contenido de estos ácidos grasos pareciera estar gobernado por un efecto genético de dominancia hacia un menor contenido, ya que en el análisis masal de semillas F<sub>2</sub>(A10xDIA) el contenido de estos ácidos grasos fue menor a la media entre ambos parentales y similar al padre de menor valor. Pérez Vich *et al.* (1999 a, b; 2002 a; 2004) también observaron un efecto de dominancia hacia un menor contenido de estos

ácidos grasos, aún con mutantes alto palmítico y alto esteárico. La característica de alto palmítico y alto esteárico de las líneas mutantes de girasol evaluadas por los autores citados se expresó en forma recesiva. Este también parece ser el caso de DIA, ya que el aumento de los retrocruzamientos con DIA aumentó la proporción de individuos con mayor contenido de ácido palmítico y esteárico.

El aumento de ácido palmítico, 10 g/kg, y de esteárico, 6 g/kg, en los retrocruzamientos con DIA no fueron en magnitud tan significativos como aquellos obtenidos mediante mutagénesis, superior a 200 g/kg de aceite (Fernández Martínez *et al.* 1997; Pérez Vich *et al.* 1999 a, b, 2002 a, 2004; Velasco *et al.* 2008), pero indicaría la presencia de genes menores, quizás de carácter recesivo, que podrían ser de utilidad para aumentar el contenido de estos dos ácidos grasos en los mutantes de girasol con alto esteárico y alto palmítico.

Contrariamente a lo esperado, en la evaluación masal del perfil ácido, B10 tuvo una variación fenotípica en el contenido de ácido palmítico y esteárico mayor que las RUD. Posiblemente esta condición se debió a que la cantidad de plantas que conformaron el conjunto de semillas analizadas en cada muestreo fue reducida, menor o igual a cinco, y a que estos caracteres no se encuentran en homocigosis en esta línea. Putt y Carson (1969) analizaron granos individuales de 56 líneas de girasol endocriadas cultivadas en un jardín común, y observaron que había variación en el perfil ácido dentro de cada línea, aún en aquellas con nueve ciclos de endocría. En cambio en las RUD, el conjunto de semillas analizadas en cada muestreo provenía de entre 20 y 30 individuos, lo que pudo haber contribuido con un mayor grado de homogeneidad del perfil ácido en cada muestreo.

En el análisis de semillas individuales, el máximo contenido de ácido palmítico y esteárico, 87,6 y 73,4 g/kg, se observó en el BC1F2 del cruzamiento con DIA. Estas concentraciones sobrepasaron el límite superior del rango observado en girasol tradicional, que es de 80,0 y 70,0 g/kg, respectivamente (Bervillé 2010). En base a las concentraciones máximas de ácido palmítico y esteárico observadas en este retrocruzamiento con DIA, se hubiese esperado encontrar un individuo con una composición de ácidos grasos saturados de 161 g/kg, que correspondería a la mitad del valor de ácidos grasos saturados que presentan las líneas mutantes. Sin embargo el individuo con mayor contenido de ácidos grasos saturados presentó 120 g/kg, 41 g/kg

menos que ese umbral. En el BC2F1 con DIA se observó la misma singularidad. La falta de individuos con una combinación de ácido esteárico y palmítico más alta podría deberse a que la cantidad de semillas analizadas no fue suficiente o a una interacción epistática entre los loci que controlan la síntesis de estos ácidos grasos. Pérez Vich *et al.* (2000) observaron una interacción epistática entre los genes que controlan el carácter alto palmítico y alto esteárico en el cruzamiento de un mutante alto palmítico con un mutante alto esteárico, ya que la conjunción de ambos genes mutantes en un mismo genotipo no produjo el fenotipo esperado, alto palmítico más alto esteárico.

En este trabajo, al igual que Cantamutto *et al.* (2008 a, b), DIA tuvo un contenido de ácido oleico bajo, 154,7 y 135,0 g/kg respectivamente, y alto de ácido linoleico, 731 y 743 g/kg respectivamente. Estos valores fueron cercanos al límite inferior de ácido oleico, 140 g/kg, y al superior de ácido linoleico, 740 g/kg, observados para los híbridos de girasol tradicional, respectivamente (Bervillé 2010).

El efecto genético sobre el contenido de ácido oleico y linoleico del cruzamiento de DIA y RIV con A10, en el análisis del perfil ácido de semillas en forma masal, fue distinto. El contenido de ácido oleico y linoleico en la F2(A10xDIA) fue más similar a DIA que a la línea cultivada. Esto implicaría un efecto de dominancia hacia menor síntesis de ácido oleico y mayor de ácido linoleico en el aceite de las semillas. Sin embargo en la F2(A10xRIV), el contenido de estos dos ácidos grasos fue similar a la media entre los padres, lo que correspondería a un efecto genético de aditividad. El estudio del control genético con mutantes alto oleico, ha determinado que este carácter está controlado por la acción conjunta de más de un gen. La mayoría de los trabajos publicados concuerdan que el gen mutante tiene un efecto dominante, que aumenta la síntesis de ácido oleico, aunque esta síntesis también está controlada por otros genes que modifican el contenido total de este ácido graso (Velasco *et al.* 2000). Las líneas que tienen esta mutación presentan en la composición ácida de sus granos más del 70% de ácido oleico (Bervillé 2010). En función de los valores de ácido oleico obtenidos en las RUD y la línea B10, se podría pensar que éstas no poseerían el gen mutante y que el patrón disímil en la segregación de la F2 de los cruzamientos se debe a que las RUD, utilizadas como parentales masculinos, tendrían diferencias genéticas entre sí para este carácter. Debido a esto y a que este rasgo está regulado por la acción conjunta de más de un gen, la combinación de cada RUD, DIA o RIV, con el parental femenino A10, produjo un fenotipo y efecto genético singular.

Pocos estudios se han realizado para determinar el control genético de la síntesis de ácido linoleico. Simpson *et al.* (1989) mencionan que el carácter alto linoleico está regulado por la acción recesiva parcial de un gen, en cambio Škorić (2012 b) menciona que Hristova y Georgieva Todorova (1975) observaron la expresión del carácter de forma dominante, aditiva y recesiva en distintas cruzas. En este trabajo se observaron efectos de aditividad y dominancia parcial hacia mayor contenido de ácido linoleico. Por lo que también se podría hipotetizar que existen diferencias genéticas entre DIA y RIV, y que por esta razón la combinación de cada RUD con la línea A10, produjo un fenotipo y efecto genético singular.

En el análisis del perfil ácido de semillas individuales, un individuo del BC1F2 del cruzamiento con DIA tuvo más de 500 g/kg de ácido oleico, mientras que en los retrocruzamientos con BAR el contenido máximo de este ácido graso no superó los 400 g/kg. La concentración de ácido oleico en el BC1F2 de DIA es similar a la observada en las variedades medio oleico disponibles en el mercado (Burton *et al.* 2004). Esta situación sugiere que algunos individuos en DIA podrían tener genes que aumenten la concentración de este ácido graso. En la F3(B09xDIA), se observó un individuo con 784 g/kg de ácido linoleico y menos de 150 g/kg de ácido oleico. Pocas líneas han sido desarrolladas con el carácter alto linoleico. Aquellas que presentan el mayor contenido de éste ácido graso poseen una concentración similar a la observada en este individuo (Simpson *et al.* 1989; Fernández Martínez *et al.* 2007). El hecho de que un mismo individuo posea el mayor y menor contenido de ácido linoleico y oleico respectivamente no es fortuito. La síntesis de estos ácidos grasos está relacionada bioquímicamente (Kinney 1994; Harwood 1996), de manera que entre ellos existe una correlación negativa muy alta, que se ha observado tanto en girasol cultivado (De Haro y Fernández Martínez 1991; Bervillé 2010; Škorić 2012 b) como en silvestre (Seiler 1983, 1986).

La identificación de características singulares en el contenido de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico en individuos de los cruzamientos con DIA, podría significar que esta RUD es una fuente de genes interesante para incorporar en programas de mejoramiento de calidad de aceite de girasol. Las especies silvestres han contribuido a aumentar la base genética del girasol cultivado con numerosos rasgos de gran utilidad, destacándose la esterilidad citoplasmática, la resistencia a imidasolinonas y la resistencia a enfermedades como la roya (Seiler y Jan 2010; Seiler 2012). DIA podría seguir aumentando esa base genética con respecto a la composición ácida del

aceite de girasol. Además podría contribuir con un *background* novedoso para los programas de mutagénesis desarrollados para obtener nuevos perfiles acídicos, ya que el *background* genético en estos programas es determinante para la obtención de nuevas combinaciones genéticas (Fernández Martínez *et al.* 1997).

Los caracteres de interés agronómico son fácilmente introgresados al girasol cultivado cuando la fuente silvestre donante es la especie *H. annuus*, como es el caso de DIA. Si bien el cruzamiento interespecífico es factible en girasol, las barreras de infertilidad limitan las posibilidades de introgresión (Seiler y Jan 2010). Esta es una razón más para tener en cuenta a la población DIA, como recurso fitogenético para la mejora de girasol cultivado en relación a la calidad de aceite.

El porcentaje de aceite del grano de las poblaciones silvestres de *H. annuus* (Seiler 2007) como en las naturalizadas en Argentina (Cantamutto *et al.* 2008 a, b) es menor, cercano al 25%, que el de las variedades cultivadas, que supera al 40% (López Pereira *et al.* 2006). Sin embargo, la baja concentración de aceite no debería ser un factor limitante para su utilización en el mejoramiento de la calidad del aceite de girasol (Seiler 2007), ya que el contenido de aceite es un rasgo con alto valor de heredabilidad. El cual puede ser seleccionado fácilmente en los programas de mejoramiento mediante la técnica no destructiva de resonancia magnética nuclear (Vear 2010).

En el análisis del perfil acídico de semillas en forma masal, el contenido de ácido palmítico y esteárico de la F3(A10xDIA) y de la F3(A10xRIV) fue similar a su respectiva F2, corroborando los efectos genéticos del contenido de estos ácidos grasos sobre la descendencia. En cambio, el efecto genético de dominancia hacia menor contenido de ácido oleico y mayor de linoleico en la F2(A10xDIA), fue revertido en la F3(A10xDIA). A diferencia de la F2, la F3 tuvo mayor contenido de ácido oleico y menor de linoleico y estadísticamente fue similar a B10 y no a DIA.

Pérez Vich *et al.* (2004) observaron una situación similar a esta. La F3 del cruzamiento de la línea P21, con androesterilidad nuclear, y CAS 14, mutante alto esteárico fértil, presentaba contenidos mayores de ácido esteárico que la F2. Esto implicaba también una reversión del efecto de dominancia hacia menor contenido de ácido esteárico observado en la F2. Los autores descubrieron que este fenómeno se debía a que el locus que controlaba el carácter alto esteárico en CAS 14 estaba ligado en repulsión con el

locus de androesterilidad nuclear de la línea P21. Por eso la mayoría de los individuos fértiles de la F2, que participaron en la generación de semillas F3, tenían contenidos de ácido esteárico elevados, mientras que las plantas F2 androestériles, que no se autofecundaron, presentaban en su mayoría bajo contenido de este ácido graso.

En cártamo (*Carthamus tinctorium*), especie que como el girasol es de la familia Asteracea, Carapetian y Knowles (1993) observaron una situación similar a la anterior. Las plantas F2 fértiles, del cruzamiento entre una línea alto linoleico fértil y una línea tradicional estéril, tenían mayor contenido de ácidos grasos insaturados que lo esperado. En este trabajo se determinó un ligamiento entre el carácter de androesterilidad y la composición de ácidos grasos insaturados.

Al igual que Carapetian y Knowles (1993) y Pérez Vich *et al.* (2004) las semillas F2 y F3 fueron generadas solamente a partir de plantas F1 y F2 fértiles. Ya que a partir de R4 los capítulos fueron tapados con bolsas de poliacrilamida, para excluir polinizadores, y no hubo intervención humana durante la fecundación.

Como el cruzamiento de DIA y RIV se realizó con la línea A10, androestéril con citoplasma estéril tipo PET1, probablemente la F1 y la F2 haya estado compuesta por una proporción diferente de plantas fértiles y estériles. En las poblaciones silvestres de *H. annuus* los genes restauradores de la fertilidad del citoplasma androesteril PET1 son comunes (Domínguez Giménez y Fick 1975; Seiler y Jan 1994), como así también en las poblaciones naturalizadas en Argentina (Garayalde *et al.* 2015). Cantamutto *et al.* (2010 b) observaron que la restauración de la fertilidad en la F1 del cruzamiento de A10 con poblaciones argentinas de girasol fue mayor a 85%. En este trabajo probablemente la F1 tuvo menos de 15% de plantas androestériles. En cambio, en la F2 probablemente la cantidad de plantas androestériles haya ascendido a 25%. Debido a que el carácter está gobernado principalmente por un gen con acción dominante, la segregación de la F1 heterocigota probablemente haya sido 3:1, plantas fértiles: estériles (Domínguez Giménez y Fick 1975; Seiler y Jan 1994).

La generación de semillas, en este cruzamiento, no solo estaría gobernada por la fertilidad masculina de las plantas intervinientes sino también por el nivel de autofecundación de las mismas. Es factible que la mayoría de las semillas F3 del cruzamiento de A10 con DIA o RIV, hayan sido generadas por plantas F2 con medio a

alto nivel de autofecundación, ya que estas plantas contaron con dos ciclos de selección directa en favor de este carácter. La F1 de la cruce de poblaciones silvestres de *H. annuus* (bajo nivel de autogamia; Miller y Fick 1997), similares a DIA y RIV (menor a 20%, Pressotto 2004), con cultivares mejorados de girasol (generalmente autofecundación mayor a 40%; Miller y Fick 1997; Škorić 2012 b), en general tienen bajo nivel de autofecundación (Gandhi *et al.* 2005). Debido principalmente a la auto incompatibilidad esporofítica de las poblaciones silvestres (Miller y Fick 1997) que se trasmite de forma dominante a la descendencia y limita fuertemente la autofecundación. Sin embargo la dominancia genética sobre la autoincompatibilidad no es completa (Burke *et al.* 2002; Gandhi *et al.* 2005), y la autofecundación tiene un alto valor de heredabilidad (Škorić 2012 b), según Gowda y Seetharam (2008) mayor a 70%, por lo que es posible obtener semillas generadas por autofecundación en la F1 y aumentar rápidamente el nivel de autofecundación por selección.

Gandhi *et al.* (2005) y, Wills y Burke (2007) observaron que la autofecundación estaba regulada por varios QTLs, dos de los cuales se encontraban situados en los grupos de ligamientos 1 y 6, en donde también se han observado QTLs involucrados en la síntesis de ácido oleico y linoleico (Burke *et al.* 2005).

Tomando en cuenta lo observado por Carapetian y Knowles (1993), Pérez Vich *et al.* (2004), Gandhi *et al.* (2005), Wills y Burke (2007), Burke *et al.* (2005) y los resultados presentados en este trabajo la reversión de la dominancia del contenido de ácido oleico y linoleico observada en la F3 del cruzamiento de A10 con DIA o RIV con respecto a la respectiva F2, podría deberse a un ligamiento entre genes que controlan la síntesis de uno o dos de los ácidos grasos mencionados, la fertilidad y/o la autofecundación.

El posible ligamiento entre la síntesis de estos ácidos grasos y la autofecundación y/o la fertilidad observado debería ser estudiado en detalle, ya que si se determina que estos rasgos están relacionados genéticamente contribuiría con el manejo de los cruzamientos y la selección de individuos en los programas de mejoramientos de calidad de aceite.

Los cruzamientos F3(B09xDIA) y BC1F2(B09xDIA)casxDIA que presentaron individuos con perfiles acídicos de interés fueron depositados en el Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi, registrados bajo la denominación CGGI1358 y CGGI1359, respectivamente.

## CONCLUSIONES

A partir de la hipótesis y objetivo de trabajo planteados emergen las siguientes conclusiones:

En la determinación masal del perfil ácido, DIA presentó valores relativamente altos de concentración de ácido palmítico y esteárico. Sin embargo en la F2 y F3 de los cruzamientos con DIA, el contenido de ácido palmítico y esteárico fue inferior a la media entre los parentales, similar a B10 el padre de menor valor. Por lo que es posible que el contenido de estos ácidos grasos esté gobernado por un efecto de dominancia genética hacia un menor contenido.

En el análisis del perfil ácido de granos individuales se observó que el retrocruzamientos con DIA produjo un aumento del contenido medio y máximo de ácido palmítico y esteárico. En concordancia con los resultados previos, el incremento de la proporción de estos ácidos grasos en el perfil ácido parece estar bajo control genético recesivo.

Al determinar individualmente el perfil ácido de cada embrión de los cruzamientos con DIA, se observó que DIA proporcionó gran variabilidad al contenido de ácidos grasos de los mismos. Consecuentemente individuos con perfiles ácidos peculiares se identificaron mediante el análisis individual de los granos. Un individuo del BC1F2 generado a partir del cruzamiento entre A09 y DIA tuvo 87,6 g/kg de ácido palmítico, mientras que otro individuo tuvo 73,4 g/kg de ácido esteárico. Otro individuo de este retrocruzamiento tuvo 534 g/kg de ácido oleico, similar valor a los cultivares medio oleico disponibles en el mercado (Burton *et al.* 2004). Asimismo, en la F3(B09xDIA) un individuo presentó 784 g/kg de ácido linoleico, similar valor a líneas endocriadas alto linoleico.

# **CAPÍTULO 5:**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS  
STOCKS GENÉTICOS DEPOSITADOS EN EL  
BANCO ACTIVO DE GERMOPLASMA DEL INTA  
MANFREDI**



## INTRODUCCIÓN

La domesticación del girasol sucedió en Estados Unidos de América, por lo menos hace 3000 años antes de Cristo, por los pobladores originarios de esas tierras. La evidencia indica que el girasol cultivado era monocefálico, de estructura similar a los cultivares actualmente utilizados. Su utilización era diversa, la pepita se empleaba en la preparación de comidas, los pigmentos del pericarpio como tintura, las fibras del tallo para fabricar tejidos y el aceite para aplicaciones en la piel y el pelo. Luego de la colonización europea del continente americano, el girasol fue introducido a Europa. El primer registro de la utilización del girasol como un cultivo oleaginoso fue en Rusia, a finales del siglo XVIII. A partir de ese momento el cultivo se expandió rápidamente en este país y otros países de Europa (Putt 1978).

En el continente americano el girasol fue reintroducido nuevamente, ahora como cultivo oleaginoso, a finales del siglo XIX en Estados Unidos de América (Putt 1978) y a principios del siglo XX en Argentina (Bertero de Romano y Vasquez 2003).

Actualmente los principales países productores de girasol son Ucrania, Rusia, Argentina y Turquía, en orden decreciente (USDA 2016).

Simultáneamente con su expansión en Rusia y en el continente americano comenzó la mejora de las características agronómicas del cultivo. Desde entonces el mejoramiento genético permitió desarrollar cultivares con diferente duración del ciclo ontogénico, aumentar el contenido de aceite de 36% a más de 50%, obtener resistencia a orobanche, roya y otras enfermedades, aumentar el rendimiento, explotar el fenómeno de heterosis mediante el descubrimiento de la androesterilidad citoplasmática, incorporar resistencia a herbicidas y modificar la calidad del aceite (Putt 1978; Škorić 2012 b).

En mejoramiento vegetal, para lograr la conquista de los objetivos propuestos se requiere principalmente una adecuada diversidad genética, otorgada por los recursos genéticos disponibles. Un recurso fitogenético es todo aquel individuo o grupo de individuos vegetales que presentan características específicas que permiten distinguirlos del resto de los recursos genéticos vegetales, ya sea un genotipo, una accesión de germoplasma, una variedad cultivada, una población natural, una especie (en el sentido taxonómico) o un género, entre otros (Núñez Colín y Escobedo López 2014). Los recursos fitogenéticos del girasol típicamente utilizados son: poblaciones locales,

cultivares obsoletos y actuales, líneas endocriadas, variedades y especies silvestres del género *Helianthus*.

Las especies silvestres han contribuido con el desarrollo de resistencia a enfermedades (Báez y Mácola 1954; Putt y Sackston 1957; Bertero de Romano y Vasquez 2003; González *et al.* 2014), a insectos (Rogers 1992), tolerancia a herbicidas (Al Khatib *et al.* 1998) y desarrollo de la androesterilidad citoplasmática (Seiler y Jan 2010).

En Argentina, se ha utilizado recurso fitogenético silvestre para desarrollar cultivares de girasol. Bertero de Romano y Vasquez (2003) menciona la utilización de *H. annuus* ssp. *annuus*, *H. debilis* y *H. argophyllus* en el desarrollo de cultivares con resistencia *Puccinia helianthi*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Plasmopara alstedii* y resistencia a sequía.

Nueve stocks genéticos con rasgos relevantes para el mejoramiento de girasol fueron desarrollados en el presente trabajo. Dos de ellos son tolerantes a temperatura subóptima durante germinación-V2 (SG:TF: 8TF y 10 TF), 8TF presenta mayor velocidad de germinación y 10TF mayor germinación acumulada y desarrollo de la planta joven a temperatura subóptima; otro tiene resistencia a déficit hídrico en la etapa reproductiva (SG:RIV-FS); otros cuatro son resistentes a SuCMoV-C (SG: SuCMoV-C: SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3 y SuCMoV-C.4); y otros dos contienen rasgos novedosos de calidad de aceite (SG:ACEITE: F3(B09xDIA) y F2(B09xDIA)casxDIA), F3(B09xDIA) tuvo un individuo con alto contenido de ácido linoleico (784,4 g/kg), mientras que F2(B09xDIA)casxDIA tuvo un individuo con alto ácido palmítico (87,6 g/kg), otro con alto ácido esteárico (73,4 g/kg) y otro con relativamente alto ácido oleico (533,8 g/kg). Estos stocks genéticos fueron depositados en el Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi.

Algunos de estos germoplasmas son generaciones avanzadas derivadas del cruzamiento entre líneas endocriadas y *H. annuus* ssp. *annuus* naturalizado en Argentina con distinto grado de endocría, mientras que otros son selecciones de plantas *H. annuus* ssp. *annuus* con mejor performance.

En la gestión de un programa de mejoramiento genético es fundamental conocer los atributos particulares de cada individuo del programa. Además en los bancos de germoplasma la caracterización es el primer paso para conocer el germoplasma a conservar (Núñez Colín y Escobedo López 2014).

Se supone que los stocks genéticos desarrollados presentan características fenotípicas particulares que los distingue, además del rasgo principal por el cual fueron seleccionados.

El objetivo de este trabajo fue la descripción fenotípica de los SG:TF, el SG:RIV-FS, los SG:SuCMoV-C y los SG:ACEITE.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se caracterizó a plantas y frutos, de los dos SG:TF, del SG:RIV-FS, de los cuatro SG:SuCMoV-C y de los dos SG:ACEITE (Tabla 5.1). El cultivo y multiplicación, en forma controlada, de las plantas se realizó en un jardín común en el campo experimental del Departamento de Agronomía en la Universidad Nacional del Sur (CE-UNS; S 38° 41' 38'' W 62° 14' 53'').

La semilla de cada stock genético fue preacondicionada para inducir la germinación en semillas dormantes con un tratamiento de estratificación por 7 días a 4-5°C (ISTA 2004), previo a la siembra. Una vez germinadas, se dispusieron en bandejas multiceldas (70cc) rellenas con sustrato MULTIPRO® de Terrafertil, compuesto de turba de musgo Sphagnum de fibra media y fina, vermiculita, cal calcita, cal dolomita, agentes humectantes y fertilizante, el 29 de octubre de 2014 y el 5 de noviembre de 2011. Se cultivaron en invernáculo hasta su trasplante, cuando las plantas tuvieron el primer o el segundo par de hojas desarrollado, aproximadamente un mes después. Las plantas se dispusieron agrupadas por germoplasma en parcelas con ocho a treinta y un individuos espaciados cada 30 cm. La demanda de agua fue abastecida mediante riego por goteo.

**Tabla 5.1:** Stocks genéticos caracterizados.

SG:TF: stocks genéticos tolerantes a temperatura subóptima durante germinación-V2. SG:RIV-FS: stock genético resistente a déficit hídrico.

SG:ACEITE: stock genético con rasgos novedosos de calidad de aceite. SG:SuCMoV: stocks genéticos resistentes a SuCMoV-C.

Stock genético	Generación evaluada		Citoplasma	Año de caracterización	Referencia en esta tesis
	Planta	Fruto			
<b>SG:TF</b>					
<b>8TF</b>	F4	F5	Androesteril-PET1	2014-15	Capítulo 1
<b>10TF</b>	F4	F5	Androesteril-PET1		
<b>SG:RIV-FS</b>					
<b>RIV-FS</b>	F3 Sib	F4 Sib	<i>H. annuus</i> ruderal	2014-15	Capítulo 2
<b>SG:SuCMoV-C</b>					
<b>SuCMoV-C.1</b>	F1	F2	Androesteril-PET1	2014-15	Capítulo 3
<b>SuCMoV-C.2</b>	F1	F2	Androesteril-PET1		
<b>SuCMoV-C.3</b>	F4	F5	<i>H. annuus</i> normal		
<b>SuCMoV-C.4</b>	F4	F5	Androesteril-PET1		
<b>SG:ACEITE</b>					
<b>F3(B09xDIA)</b>	F2(B09xDIA)	F3	<i>H. annuus</i> normal	2011-12	Capítulo 4
<b>F2(A09xDIA)casxDIA</b>	-	F2(B09xDIA)casxDIA	Androesteril-PET1		

En planta, se determinó la altura (ALT), el número de hojas del vástago principal (NHO) y total de capítulos (NCA) producidos. La superficie foliar (SUF), de una hoja situada a media altura del vástago principal, se estimó a través de la medición del ancho foliar según las ecuaciones propuestas por Aguirrezábal *et al.* (1996) citadas en la página 76 de esta tesis.

Se registró el porcentaje de plantas con presencia de capítulo principal (CAP), de antocianas (ANT) en el tallo o en el pecíolo de las hojas, y con ramificaciones (RAM) en el vástago principal. Las plantas que presentaban ramificaciones se subclasificaron en ramificaciones de tipo apical, basal o total.

La cantidad de semillas autofecundadas por capítulo (SAF) se contabilizó en uno o dos capítulos por planta. Se determinó el largo (LCI) y ancho (ACI) del pericarpio en 20 a 40 cipselas de cada germoplasma y la biomasa fresca de mil cipselas (B1000) estimada en función del peso fresco de por lo menos cuatro muestras de 30 a 150 cipselas por germoplasma, según la ecuación 3.

$$B1000 \text{ (g)} = (1000 * PF_{cip}) / N_{cip} \quad [3]$$

Siendo B1000: biomasa fresca de 1000 cipselas, PF<sub>cip</sub> (g): Peso fresco de las cipselas, N<sub>cip</sub>: número de cipselas.

Se describió el color y la presencia de estrías o motas en el pericarpio de las semillas.

Se determinó la cantidad de días transcurridos desde la germinación hasta que el 50% de las plantas se encontraban en el estado fenológico R5 (G-R5) y hasta que el 50% de las plantas se encontraban en R9 (G-R9), según la escala fenológica descrita por Schneiter y Miller (1981).

Se observó incidencia de verticilosis, según sintomatología visual, durante el cultivo en 2014-15. La incidencia de plantas afectadas por este patógeno, y la severidad del ataque se estimaron mediante el porcentaje de hojas afectadas por la enfermedad en cada planta a floración. La severidad fue clasificada en baja, plantas poco afectadas (PA), con el tercio basal de las hojas secas; intermedia, moderadamente afectadas (MA) con el 30-70% de las hojas secas; y alta, severamente afectadas (SA) con más del 70% de las hojas secas.

## RESULTADOS

La altura de los SG:SuCMoV-C varió entre 95 y 177 cm, la de los SG:TF fue menor a 100 cm, mientras que la del SG:RIV-FS superó los 200 cm (Tabla 5.2).

Los SG:SuCMoV-C y SG:TF tuvieron entre 22 y 27 hojas sobre el vástago principal, mientras que RIV-FS tuvo más de 40 (Tabla 5.2).

La superficie foliar más pequeña se observó en los SG:TF con menos de 20 cm<sup>2</sup>, seguida por RIV-FS y por los SG:SuCMoV-C con más de 90 cm<sup>2</sup> (Tabla 5.3).

En su mayoría, las plantas tuvieron ramificaciones laterales y presentaron más de cuatro capítulos, siendo RIV-FS la de mayor producción, con más de 40 capítulos por planta. En 8TF, 10TF y F2(B09xDIA) más del 20% de los individuos fueron monocéfalos. En todos los casos se observó la presencia de un capítulo principal de mayor tamaño, salvo en la mayoría de las plantas de RIV-FS (Tabla 5.3).

La plena floración sucedió entre 99 y 107 días después de la germinación de las semillas en los SG:SuCMoV-C y SG:TF. En RIV-FS fue alrededor de 20 días después. En general, el período de floración es extenso, más de dos semanas. El estado fenológico R9 fue alcanzado entre 26 y 58 días después de floración según la escala de desarrollo de Schneiter y Miller (1981) (Tabla 5.2).

El número de semillas generadas por autofecundación fue entre 54 y 101 en los SG:SuCMoV-C, y entre 103 y 180 en los SG:TF (Tabla 5.2).

La biomasa de mil cipcelas de los SG:SuCMoV-C y SG:TF se estableció entre 12,4 y 33,3 g, mientras que el de RIV-FS fue levemente inferior a 12 g. La biomasa de las cipcelas de los stocks genéticos con rasgos novedosos en la calidad de aceite fue mayor, superando los 37 g cada mil cipcelas (Tabla 5.2).

El largo de las cipcelas fue mayor a 6 mm y el ancho mayor a 3 mm en los SG:SuCMoV-C, SG:TF y SG:ACEITE, mientras que en RIV-FS el largo y el ancho del fruto fue inferior (Tabla 5.2).

Las antocianinas sobre el tallo o los peciolo de las hojas estuvieron presentes en la mayoría de las plantas de los SG:SuCMoV-C, salvo en SuCMoV-C.3, y RIV-FS. En cambio, la mayoría de las plantas de los SG:TF no presentaron pigmentos, aunque 10TF tuvo 40% de individuos pigmentados (Tabla 5.3).

El color de fondo del pericarpio de las cipselas fue blanco, beige, marrón, gris o negro. Las cipselas presentaron en su mayoría estrías y a veces también exhibieron motas sobre el pericarpio. El color de las estrías varió entre blancas, negras y grises, el color de las motas fue siempre negro (Tabla 5.3).

Las semillas depositadas en el Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi de SuCMoV-C.3, SuCMoV-C.4, 8TF y 10TF tuvieron 4 generaciones de autofecundación y, salvo en SuCMoV-C.3, el citoplasma derivó de una línea con androestérilidad citoplasmática tipo PET1. El citoplasma de los stocks genéticos SuCMoV-C.1 y SuCMoV-C.2 también descendió de una línea con androestérilidad citoplasmática PET1, aunque tuvieron un ciclo de autofecundación. En cambio el citoplasma de las semillas del stock genético F3(B09xDIA) derivó de una línea con citoplasma normal y tuvieron dos ciclos de autofecundación. El stock genético F2(B09xDIA)casxDIA tuvo un ciclo de autofecundación seguido de una retrocruza con la RUD DIA; con citoplasma normal. RIV-FS no tuvo ninguna generación mediada por autofecundación.

Durante el cultivo en el CE-UNS en 2014-15 se observó una alta incidencia de verticilosis en algunos de los stocks genéticos desarrollados (Tabla 5.3).

**Tabla 5.2:** Caracteres métricos (media  $\pm$  error estandar) descriptivos de los stocks genéticos tolerantes a temperatura subóptima durante germinación-V2 (SG:TF), resistente a déficit hídrico (SG:RIV-FS), resistentes a SuCMoV-C (SG:SuCMoV-C) y con rasgos novedosos de calidad de aceite (SG:ACEITE).

ALT: altura de planta. NHO: hojas por planta. NCA: capítulos por planta. SUF: superficie foliar. SAF: semillas autofecundadas por capítulo. B1000: biomasa de mil cipselas. LCI: largo de la cipsela. ACI: ancho de la cipsela. G-R5: días desde la germinación hasta floración. G-R9: días desde la germinación hasta senescencia. -: sin datos

Stock genético	ALT (cm)	NHO (núm.)	SUF (cm <sup>2</sup> )	NCA (núm.)	SAF (núm.)	B1000 (g)	LCI (mm)	ACI (mm)	G-R5 (días)	G-R9 (días)
<b>SG:TF</b>										
<b>8TF</b>	87,6 $\pm$ 6,0	22 $\pm$ 2	16,0 $\pm$ 1,3	4 $\pm$ 2	103 $\pm$ 25,3	23,1 $\pm$ 0,4	8,7 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,1	102	149
<b>10TF</b>	89,7 $\pm$ 6,3	26 $\pm$ 1	19,1 $\pm$ 1,8	8 $\pm$ 1	180 $\pm$ 22,8	18,9 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,1	99	157
<b>SG:RIV-FS</b>										
<b>RIV-FS</b>	272,4 $\pm$ 10,4	43 $\pm$ 2	25,2 $\pm$ 1,0	41 $\pm$ 10	-	11,7 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1	123	173
<b>SG:SuCMoV-C</b>										
<b>SuCMoV-C.1</b>	126,5 $\pm$ 10,3	27 $\pm$ 1	171,1 $\pm$ 28,5	18 $\pm$ 6	62 $\pm$ 14	23,8 $\pm$ 2,5	7,2 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,1	107	140
<b>SuCMoV-C.2</b>	176,4 $\pm$ 6,8	26 $\pm$ 1	295,6 $\pm$ 21,4	22 $\pm$ 3	83 $\pm$ 15	28,8 $\pm$ 2,3	7,3 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,1	104	147
<b>SuCMoV-C.3</b>	95,5 $\pm$ 5,2	25 $\pm$ 1	96,1 $\pm$ 13,6	6 $\pm$ 1	54 $\pm$ 15	12,4 $\pm$ 0,7	6,2 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,1	107	133
<b>SuCMoV-C.4</b>	144,2 $\pm$ 5,5	27 $\pm$ 1	235,9 $\pm$ 21,9	17 $\pm$ 3	101 $\pm$ 41	33,3 $\pm$ 0,2	8,6 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,2	104	154
<b>SG:ACEITE</b>										
<b>F3(B09xDIA)</b>	-	-	-	-	-	37,4 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,1	-	-
<b>(F2(B09xDIA))casxDIA</b>	-	-	-	-	-	37,6 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,1	-	-

**Tabla 5.3:** Caracteres categóricos descriptivos de los stocks genéticos tolerantes a temperatura subóptima durante germinación-V2 (SG:TF), resistente a déficit hídrico (SG:RIV-FS), resistentes a SuCMoV-C (SG:SuCMoV-C) y con rasgos novedosos de calidad de aceite (SG:ACEITE).

RAM: tipo de ramificación del vástago principal. RA: ramificación apical. RB: ramificación basal. RT: ramificación total. CAPR: presencia de capítulo principal. ANT: presencia de antocianas. VERT: sintomatología de verticilosis. PA: poco afectada. MA: moderadamente afectada. SA: severamente afectada. Au: ausente. -: sin datos.

Stock genético	RAM				CAPR	ANT	VERT				Pericarpio	Otros rasgos
	Au	RA	RB	RT			Au	PA	MA	SA		
(%)												
<b>SG:TF</b>												
<b>8TF</b>	21,4	78,6	0	0	100	0	14,3	50	0	35,7	Negro con estrías grises o negro con estrías blancas.	Presencia de plantas androestériles.
<b>10TF</b>	26,7	53,3	0	20	100	40	33,3	60	0	6,7	Negro con estrías grises. A veces totalmente negras.	Presencia de plantas androestériles o con flores liguladas de forma tubular.
<b>SG:RIV-FS</b>												
<b>RIV-FS</b>	0	30	0	70	30	100	-	-	-	-	Gris o marrón con motas negras, a veces también con estrías negras.	-
<b>SG:SuCMoV-C</b>												
<b>SuCMoV-C.1</b>	5	28	0	67	100	67	0	28	22	50	Gris con estrías blancas. Negro con estrías grises. Blanco con estrías negras. Marrón estrías negras. A veces con motas negras.	Presencia de plantas androestériles. Algunas plantas con flores liguladas de forma tubular.
<b>SuCMoV-C.2</b>	0	16	0	84	100	68	0	42	21	37	Gris con estrías blancas o negra. Negro con estrías grises. Marrón con estrías negras. A veces con motas negras.	Presencia de plantas androestériles. Algunas plantas con flores liguladas de forma tubular.
<b>SuCMoV-C.3</b>	10	20	13	57	100	0	0	4	31	65	Blanco con estrías negras. Negro con estrías blancas. A veces con motas negras.	-
<b>SuCMoV-C.4</b>	0	0	0	100	100	100	100	0	0	0	Negro con estrías grises o blancas.	Plantas con flores liguladas de forma tubular.
<b>SG:ACEITE</b>												
<b>F3(B09xDIA)<sup>1</sup></b>	38,3	30,0	16,7	15,0	100	-	-	-	-	-	Negro o gris, algunos beige, con estrías negras o grises. A veces también con motas negras.	-
<b>(F2(B09xDIA))casxDIA</b>						-	-	-	-	-	Gris, negro o beige con estrías negras o grises. A veces también con motas negras.	-

<sup>1</sup>: Los datos de planta asignados a F3(B09xDIA) fueron registrados sobre la F2(B09xDIA).

## DISCUSIÓN

Los SG:SuCMoV-C, SG:TF y SG:ACEITE presentaron características morfológicas, reproductivas y fenológicas intermedias entre sus parentales de tipo cultivado y silvestre, situación comúnmente observada en este tipo de cruzamientos (Gandhi *et al.* 2005; Baack *et al.* 2008; Presotto *et al.* 2011). A diferencia de SG:RIV-FS, cuyas características se asemejaron a la RUD de origen, ya que es una subpoblación de la población RIV, cuyos individuos provinieron de la selección gametofítica por resistencia a estrés osmótico.

El fin del cruzamiento de los individuos silvestres o las poblaciones segregantes selectas que poseían características de tipo silvestre, como S10: germoplasma portador del rasgo de resistencia a SuCMoV-C, con líneas cultivadas permitió incorporar rasgos característicos de cultivos domesticados (Doebley *et al.* 2006), que facilitaron el proceso posterior de selección de los stocks genéticos.

En los cuatro SG:SuCMoV-C más del 46% de los capítulos cosechados produjeron más de 40 semillas mediante autofecundación y más del 15% de los capítulos tuvieron más de 100 semillas generadas de esta forma. En el stock genético 8TF el 50% de los capítulos autofecundados y en 10TF el 90% produjeron más de 100 semillas. Se destaca que la producción de semillas por capítulo fue medida en capítulos principales y secundarios, estos últimos a veces con dimensiones inferiores a los cinco centímetros. El nivel de autofecundación de estos germoplasmas fue mayor que el observado en las poblaciones ruderales que les dieron origen. La producción de semillas por autofecundación de BAR y CAR con las que se inició la creación del parental S10 (Figura 3.1), fue establecida en 1 o 16 semillas cada 173 o 321 producidas mediante polinización libre respectivamente; AAL y DIA componentes iniciales de la genealogía de 8TF y 10TF (Figura 1.1) cuya producción de semillas por autofecundación fue de 29 o 64 semillas cada 279 o 389 producidas mediante polinización libre respectivamente (Presotto 2004). Entre los SG:SuCMoV-C, SuCMoV-C.4 fue el que produjo más semillas por autofecundación, 101 semillas por capítulo, seguido de SuCMoV-C.2 con 83 semillas capítulo<sup>-1</sup>. 10TF fue el SG:TF con mayor producción de semillas por autofecundación, mayor a 150 semillas capítulo<sup>-1</sup>.

En general las líneas endocriadas poseen la capacidad de generar más del 40% de las semillas producidas por autofecundación, más de 200 semillas por capítulo (Fick y Miller 1997; Gandhi *et al.* 2005). Mayor grado de autofecundación facilita la tarea de selección, ya que permite aumentar más rápidamente el grado de homocigosis del carácter en selección (Cubero 2003).

En los SG:SuCMoV-C, los SG:TF y los SG:ACEITE la biomasa de mil cipselas fue mayor a 20 g, salvo en SuCMoV-C.3 y, el largo y el ancho de los frutos fue igual o mayor a 6 y 3 mm respectivamente. Similar tamaño y biomasa de cipselas son observados en los cultivares de girasol utilizados para la producción de aceite (Seiler 1997; Škorić 2012 a). En cambio la biomasa, el largo y el ancho las cipselas de las poblaciones ruderales, origen de estos stocks genéticos, es menor (Fernández Moroni 2008). El SG:RIV-FS tuvo un peso y tamaño de semilla similar a las poblaciones ruderales. Semillas de mayor tamaño facilitaron la manipulación, sobre todo en las tareas de siembra y trilla. En los SG:ACEITE el cruzamiento de DIA, población ruderal con rasgos prometedores de calidad de aceite, con B09 aumentó la biomasa de la semilla más de 300% y permitió la utilización de la técnica de la media semilla para determinar el contenido de ácidos grasos (Conte *et al.* 1989; Velasco *et al.* 2008). SuCMoV-C.4 tuvo la mayor biomasa y tamaño de cipsela entre los SG:SuCMoV-C y las cipselas de 8TF fueron más grandes y pesadas que las de 10TF.

Los SG:SuCMoV-C tuvieron el capítulo del vástago principal de mayor tamaño que el de las ramificaciones, al igual que en los SG:TF y los SG:ACEITE. En general las RUD de Argentina presentan una frecuencia muy baja, menor a 10%, de plantas con el capítulo del vástago principal más grande, aunque se han observado algunas poblaciones con mayor frecuencia, hasta 50% (Presotto *et al.* 2009). RIV-FS tuvo 30% de plantas con capítulo principal. Capítulos más grandes permiten obtener más semillas y de mayor tamaño (Fick y Miller 1997). La dominancia apical es una característica de las variedades domésticas de girasol que en general son monocéfalas (Škorić 2012 a). La condición intermedia, capítulo principal más grande y ramificaciones, es una característica de la hibridación entre girasol de tipo silvestre y cultivado (Presotto *et al.* 2011).

La altura de los SG:TF fue inferior a 100 cm, mientras que la de los SG:SuCMoV-C fue inferior a 180 cm, asemejándose a la de líneas endocriadas e híbridos comerciales, que

no sobrepasan los 190 cm (Škorić 2012 a). Estos stocks genéticos poseían tres generaciones de autofecundación o fecundación fraternal lo que causa depresión por endocría. La endocría disminuye parámetros agronómicos, como la altura, sobre todo en las primeras cuatro generaciones (Fick y Miller 1997). RIV-FS en cambio tuvo una altura superior a los 200 cm, similar a lo observado Presotto *et al.* (2009) en poblaciones naturales argentinas de girasol. En el desarrollo de híbridos la altura está fuertemente influenciada por la heterosis. La altura de las líneas que intervienen en el desarrollo del híbrido debe ser 40 cm más bajas que la altura que se desea obtener para el híbrido, generalmente entre 150-180 cm (Škorić 2012 a).

Por la duración del ciclo ontogénico, mayor a 130 días, los SG:SuVMoV-C, SG:TF y SG:RIV-FS pueden considerarse como de ciclo largo (Fick 1978; Škorić 2012 a). Škorić (2012 a) considera que en los cultivares el largo del ciclo debería ser como máximo 130 días, en cambio Fick (1978) admite una duración más extensa, hasta 150 días. Salvo en el SG:RIV-FS, el largo del ciclo en los restantes stocks genéticos, considerado desde la germinación hasta R9, fue inferior a 160 días.

La semilla depositada en el Banco de Germoplasma del INTA Manfredi de SuCMoV-C.3, SuCMoV-C.4, 8TF y 10TF presentan cuatro generaciones de autofecundación, en cambio SuCMoV-C.1 y SuCMoV-C.2 poseen solo un ciclo. Un mayor grado de homocigosis se consigue a medida que aumentan las generaciones de autofecundación (Acquaah 2012).

Los SG:TF (Figura 1.1) y los SG:SuCMoV-C, salvo SuCMoV-C.3 (Figura 3.1) tienen un citoplasma androesteril tipo PET1, derivado del cruzamiento con las líneas A09 o A10. La androesterilidad ha permitido la utilización de cultivares híbridos de girasol a escala masiva (Fick y Miller 1997). En SuCMoV-C.1 y SuCMoV-C.2 se observaron plantas androestériles, al igual que en 8TF y 10TF, mientras que en SuCMoV-C.4 ello no ocurrió. Esto puede ser debido a que en SuCMoV-C.4 los genes nucleares de restauración de la fertilidad se encontraban en estado homocigota y no hubo segregación de este carácter, tal como sucede en las líneas endocriadas restauradoras de la fertilidad (Fick y Miller 1997; Acquaah 2012).

Algunos stocks genéticos presentaron flores liguladas con forma tubular. Esta es una condición poco común en girasol. Según Miller y Fick (1997) son pocos los genes que

controlan este carácter que además es de origen recesivo, por lo que no sería un problema su eliminación en cruzamientos recurrentes con líneas elite (Acquaah 2012)

Los SG:SuCMoV-C y los SG:TF presentaron síntomas de verticilosis, sobretodo SuCMoV-C.1 y SuCMoV-C.3 que tuvieron 50% o más plantas con alta severidad, con más del 70% de sus hojas secas a floración. Esta enfermedad causa grandes pérdidas productivas en Estados Unidos de América, China y Argentina, no obstante también causa pérdidas económicas en otros países (Pérez Fernández y Figueruelo 2008; Škorić 2012 b). Produce el secado anticipado de las hojas (Gulya *et al.* 1997), que disminuye el área foliar fotosintéticamente activa y produce disminuciones en la producción. Por lo que es posible que la altura de planta, superficie foliar, número de capítulos, producción de semillas autofecundadas y, peso y tamaño de los frutos puedan aumentar su valor si los germoplasmas son evaluados sin la influencia de la enfermedad; ya que la cuantía de estos rasgos es altamente dependiente de las condiciones de cultivo (Aguirrezábal *et al.* 1996).

En el stock genético SuCMoV-C.4 no se observaron síntomas de *Verticillium*, por lo que se podría pensar que este germoplasma resistente a SuCMoV-C tiene mayor nivel de resistencia que los otros germoplasmas desarrollados. Sin embargo ésta es una conclusión preliminar, debido a que la enfermedad se propaga mediante microesclerocios (forma de resistencia del hongo) formados en los tejidos de plantas infectadas que luego se distribuyen en el suelo mediante las labranzas (Gulya *et al.* 1997), por lo tanto las variaciones en la distribución y cantidad de inóculo en el suelo y la falta de un adecuado diseño experimental pueden haber contribuido con el alto nivel de resistencia observado en SuCMoV-C.4. Los stocks genéticos 8TF y 10TF también presentaron plantas sin síntomas de *Verticillium*.

A continuación, se describen las características morfológicas, reproductivas y fenológicas particulares de cada uno de los stocks genéticos y algunos rasgos de su origen genealógico.

SuCMoV-C.1 es un stock genético resistente a SuCMoV, derivado del cruzamiento entre dos plantas F3 resistentes a SuCMoV provenientes del cruzamiento entre la línea A09 con androesterilidad citoplasmática PET1 (CMS-PET1) o la línea mantenedora de A09, B09 (citoplasma *H. annuus* normal) (González *et al.* 2014; Garayalde *et al.* 2015)

y dos plantas S10 resistentes a SuCMoV (Figura 3.2). El citoplasma de SuCMoV-C.1 deriva de la línea A09 con CMS-PET1. SuCMoV-C.1 se caracterizó por poseer una altura media de 126 cm, 18 capítulos por planta y 27 hojas con una superficie foliar media de 171 cm<sup>2</sup>. Presenta segregación para el carácter de androesterilidad. La generación de semillas mediante autofecundación fue de 62 semillas por capítulo. Los frutos tuvieron una B1000 de 23,9 g, el largo y el ancho fue de 7,2 mm y 4,2 mm respectivamente. En algunas plantas las flores liguladas tuvieron forma tubular. El color del pericarpio observado fue negro, gris, blanco o marrón con estrías de color blancas o negras; en algunos casos se observaron motas negras. Las ramificaciones laterales sobre el vástago principal fueron frecuentes, aunque se observaron algunas plantas monocéfalas. La mayoría de las plantas presentó antocianas en el tallo o en los pecíolos de las hojas. El ciclo de vida tuvo una duración de 140 días desde la siembra. En el Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi se depositó un conjunto de semillas provenientes de plantas F1 fértiles autofecundadas del stock genético SuCMoV-C1.

SuCMoV-C.2 es un stock genético resistente a SuCMoV, derivado del cruzamiento entre dos plantas F3 resistentes a SuCMoV provenientes del cruzamiento entre la línea A09 con CMS-PET1 o la línea B09 con citoplasma *H. annuus* normal (González *et al.* 2014; Garayalde *et al.* 2015) y dos plantas S10 resistentes a SuCMoV (Figura 3.2). El citoplasma de SuCMoV-C.2 deriva de la línea A09 con CMS-PET1. SuCMoV-C.2 tuvo una altura media de 176 cm, 22 capítulos por planta y 26 hojas con una superficie foliar media de 296 cm<sup>2</sup>. Segregación para el carácter de androesterilidad. La generación de semillas mediante autofecundación fue de 83 semillas por capítulo. Los frutos tuvieron una B1000 de 29 g, el largo y el ancho fue de 7,3 mm y 4,2 mm respectivamente. El color del pericarpio fue negro, gris o marrón con estrías blancas, grises o negras. A veces se observaron motas negras. Todas las plantas tuvieron ramificaciones laterales sobre el vástago principal. La mayoría de las plantas presentaron antocianas en el tallo y/o en los pecíolos de las hojas. El total de las plantas presentó síntomas de verticilosis, aunque menos del 40% de las plantas fue afectada severamente. La floración ocurrió a los 104 días y el ciclo de vida tuvo una duración de 147 días desde la germinación. La semilla enviada al Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi deriva de la autofecundación de plantas F1 fértiles.

SuCMoV-C.3 es una F4 resistente a SuCMoV, derivada del cruzamiento de la línea B09 y una planta S10 resistente a SuCMoV. El citoplasma de esta generación avanzada

provino de la línea B09 con citoplasma *H. annuus* normal. SuCMoV-C.3 tuvo una altura media de 95 cm, 6 capítulos por planta y 25 hojas con una superficie foliar media de 96 cm<sup>2</sup>. La generación de semillas mediante autofecundación fue de 54 semillas por capítulo. Los frutos tuvieron una B1000 de 12,4 g, un largo de 6,2 mm y un ancho 3,4 mm. El color observado del pericarpio fue blanco o negro con estrías blancas o negras, a veces con motas negras. Las ramificaciones laterales sobre el vástago principal fueron frecuentes. Se observó un 10% de plantas monocéfalas. No se observaron antocianas en el tallo y/o en los pecíolos de las hojas. Presentó alta susceptibilidad a *Verticillium*, más del 70% de las plantas tuvieron por lo menos el 70% de sus hojas secas a floración. El ciclo de vida tuvo una duración de 133 días desde la siembra. La semilla enviada al Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi deriva de la autofecundación de plantas F4.

SuCMoV-C.4 es una F4 resistente a SuCMoV, derivada del cruzamiento de una planta S10 resistente a SuCMoV y la línea B09. El citoplasmas de este stock genético provino de S10, con citoplasma derivado de A10 con CMS-PET1. SuCMoV-C.4 tuvo una altura media de 144 cm, 17 capítulos por planta y 27 hojas con una superficie foliar media de 236 cm<sup>2</sup>. Las flores liguladas de todas las plantas tuvieron forma tubular. La generación de semillas mediante autofecundación fue de 101 semillas por capítulo. Los frutos tuvieron una biomasa de 33 g cada mil, un largo de 8,6 mm y un ancho de 4,7 mm. El color observado del pericarpio fue negro con estrías de color blanco o grises. Las plantas presentaron antocianas en el tallo y/o en los pecíolos de las hojas y ramificaciones laterales sobre el todo el vástago principal. No se observaron plantas monocéfalas ni plantas con síntomas de verticiliosis. El ciclo de vida tuvo una duración de 154 días desde la germinación. La semilla enviada al Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi deriva de la autofecundación de plantas F4.

8TF es un stock genético con tolerancia a temperatura subóptima durante germinación-V2, derivada del cruzamiento de dos líneas A09 y A10 ambas con CMS-PET1 (Garayalde *et al.* 2015; González *et al.* 2014) y tres poblaciones ruderales con tolerancia a temperatura subóptima durante germinación-V2. El citoplasma de 8TF derivó de la línea A09 CMS-PET1. 8TF tuvo una altura media de 87,6 cm y 22 hojas con una superficie foliar media de 16 cm<sup>2</sup>. Se observó una media de 4 capítulos por planta, siempre con un capítulo principal de mayor tamaño. La generación de semillas mediante autofecundación fue de 103 por capítulo. Los frutos tuvieron una biomasa de 23 g cada

mil, un largo de 8,7 mm y un ancho 3,5 mm. El color del pericarpio fue negro con estrías de color gris o blancas. Las plantas no presentaron antocianas. La mayoría de las plantas tuvieron ramificaciones en la parte apical del vástago principal. El 20% de las plantas fueron monocéfalas. El 14% de las plantas no presentaron síntomas de verticiliosis. La floración se observó a los 103 días desde la germinación, 46 días después la población estaba senescente. La semilla enviada al Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi derivada de la autofecundación de plantas fértiles F4.

10TF es stock genético con tolerancia a temperatura subóptima durante germinación-V2, derivada del cruzamiento de A10 con CMS-PET1 y tres poblaciones ruderales con tolerancia a temperatura subóptima durante germinación-V2. El citoplasma de 10TF provino de la línea A10 CMS-PET1. 10TF tuvo una altura media de 89,7 cm y 26 hojas con una superficie foliar media de 19,1 cm<sup>2</sup>. Se observó una media de 8 capítulos por planta, siempre con un capítulo principal de mayor tamaño. La generación de semillas mediante autofecundación fue de 180 por capítulo. En algunas plantas las flores liguladas tuvieron forma tubular. Los frutos tuvieron una biomasa de 18,9 g cada mil, un largo de 7,2 mm y un ancho 3,1 mm. El color del pericarpio fue totalmente negro o negro con estrías grises. El 40% de las plantas presentaron antocianas. La mayoría de las plantas tuvieron ramificaciones de tipo apical o total, un 27% fueron monocéfalas. El 33% de las plantas no presentaron síntomas de verticiliosis y en más del 50% la severidad fue baja. La floración se observó a 99 días desde la germinación, 58 días después la población se encontraba en R9. La semilla enviada al Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi derivada de la autofecundación de plantas fértiles F4.

RIV-FS es una subpoblación de RIV, conformada por individuos provenientes de la selección gametofítica por resistencia a estrés osmótico durante la fecundación. RIV-FS tuvo una altura media de 273 cm, 43 hojas con una superficie foliar media de 25,2 cm<sup>2</sup> y ramificaciones laterales en todas las plantas principalmente de tipo total. Más de 40 capítulos por planta, en algunas con un capítulo principal de mayor tamaño. Los frutos tuvieron una B1000 de 11,7 g, un largo de 5,6 mm y un ancho 2,6 mm. El color del pericarpio fue marrón o gris con motas negras, a veces también con estrías negras. Todas las plantas presentaron antocianas. La floración se observó 123 días después de la germinación, 50 días más tarde la población estaba en avanzado estado de senescencia.

Las semillas F3(B09xDIA) tuvieron una biomasa de 37,4 mg, un largo de 8,1 mm y un ancho de 4,6 mm. El pericarpio fue de color negro, gris o beige, con estrías negras o grises. A veces también con motas negras. La mayoría de las plantas parentales tuvieron ramificaciones sobre el vástago principal, aunque más del 30% fueron monocéfalas.

Las semillas F2(B09xDIA)casxDIA tuvieron una biomasa de 37,6 mg, un largo de 8,4 mm y un ancho de 4,5 mm. El pericarpio fue de color negro, gris o beige, con estrías negras o grises. A veces también con motas negras.

## CONCLUSIONES

A partir de la hipótesis y objetivo de trabajo planteados emergen las siguientes conclusiones:

Los stocks genéticos tolerantes a temperaturas subóptimas 8TF y 10TF (SG:TF), SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3, SuCMoV-C.4 (SG: SuCMoV-C), BC1F2(A09xDIA) y F3(B09xDIA) (SG:ACEITE) tuvieron características intermedias entre girasol de tipo silvestre y cultivado. Uno de los rasgos indeseados que presentan algunas de estas líneas fue la susceptibilidad a *Verticillium*. Entre los SG:SuCMoV, el SuCMoV-C.4 presentó las características más deseables para su utilización como donante de resistencia a SuCMoV-C. Las características que lo particularizaron fueron: plantas sin infección por *Verticillium*, nivel medio de autofecundación, plantas con capítulos principales de mayor tamaño que los secundarios, plantas androfértiles, citoplasma CMS-PET1, biomasa seminal mayor a 30 mg y altura de planta no excesiva. Las características fenotípicas que caracterizaron a los SG:TF fueron tamaño de planta y cipselas similar a líneas endocriadas, plantas con capítulos principales de mayor tamaño que los secundarios, nivel medio de autofecundación, citoplasma CMS-PET1 y moderada susceptibilidad a *Verticillium*. En 8TF las plantas no presentaron antocianas sobre el tallo o pecíolos, en cambio en 10TF se observaron plantas con antocianas y flores liguladas de forma tubular. El tamaño y biomasa de las cipselas de los SG:ACEITE fue similar a la observada en los cultivares de girasol que se utilizan para la producción de aceite. En estos germoplasmas queda pendiente la caracterización fenotípica a nivel de planta. El stock genético RIV-FS presentó un fenotipo similar a la población ruderal de origen; la altura de planta fue mayor a 2 m, presentó antocianas en tallos y pecíolos, numerosas ramificaciones distribuidas sobre todo el largo del vástago principal, numerosos capítulos de tamaño pequeño y cipselas pequeñas.



# CONCLUSIONES



Los resultados económicos del cultivo de girasol dependen del rendimiento logrado y de la cantidad y la calidad del aceite producido (Aguirrezal *et al.* 2002). En Argentina limitantes bióticas y/o abióticas presentes en distintas zonas de producción de girasol disminuyen el potencial de rendimiento de este cultivo (Duarte 2002; Gonzalez Montaner y Di Napoli 2002). Asimismo aceites con composición lipídica específica en función de su destino son demandados por consumidores y la industria (Melgarejo 2003).

En girasol, las especies silvestres han sido utilizadas para mantener el cultivo económicamente viable (Báez y Mácola 1954; Putt y Sackston 1957; Bertero de Romano y Vasquez 2003; González *et al.* 2014, Rogers 1992, Al Khatib *et al.* 1998, Seiler y Jan 2010. En Estados Unidos de América se estima que las especies silvestres tienen una contribución anual de 270 a 385 millones de dólares a la industria del girasol (Seiler 2010).

La finalidad de esta tesis fue la búsqueda, caracterización y selección de material genético proveniente de poblaciones naturales de *H. annuus* que pueda ser utilizado como fuente de tolerancia a temperatura subóptima durante el período de implantación, tolerancia al déficit hídrico en etapas reproductivas, resistencia al SuCMoV-C, y donante de rasgos de interés de calidad de aceite para ser incorporados en programas de mejoramiento del girasol.

Por lo expuesto anteriormente, y en función de las hipótesis y objetivos planteados en esta tesis se presentan las principales conclusiones que surgen de los resultados obtenidos.

La selección por tolerancia a temperatura subóptima durante germinación-V2 (Capítulo 1) aumentó la performance a temperatura subóptima durante la etapa de germinación y desarrollo inicial de la planta de algunas de las PSEL. La selección produjo la disminución de la temperatura basal del proceso de germinación, el aumento de la tasa de germinación y mayor desarrollo en la etapa de implantación del cultivo a temperatura subóptima de las PSEL más promisorias, 8TF y 10TF.

Una temperatura base tan baja, 2,3°C, como la observada en las PSEL solo fue reportada por González Belo *et al.* (2014) en algunos cultivares. Connor y Hall (1997), Khalifa *et*

*al.* (2000) y Trudgill *et al.* (2000), reportaron temperaturas bases mayores en el rango de 3-7°C para otros cultivares de girasol.

La producción de girasol en el sudeste y sudoeste de la región pampeana requiere de genotipos con la capacidad de establecerse en siembras realizadas a finales del invierno y principios de primavera, siembra temprana (González Montaner y Di Nápoli 2002, Duarte 2002). En estas regiones productivas, el estrés por baja temperatura, <15°C, durante la implantación es uno de los estreses más frecuentes en siembras tempranas de girasol (Aguirrezabal y Andrade 2002, Díaz Zorita *et al.* 2003). Más aún en planteos productivos que utilizan técnicas de labranza reducida, ya que la temperatura del suelo es menor en relación con la temperatura del suelo bajo labranza convencional, debido a la mayor acumulación de residuos sobre la superficie del suelo (Villalobos y Ritchie 1992).

El beneficio de la siembra temprana cuando la implantación es exitosa reside en un mayor rendimiento, ya que la temperatura durante la estación crecimiento es más baja por lo que el desarrollo no se acelera y disminuye la evapotranspiración. Asimismo los daños provocados por *Sclerotinia sclerotiorum* y *Verticillium dahliae*, principales enfermedades del girasol, disminuyen ya que las condiciones ambientales durante las etapas reproductivas del cultivo son menos favorables para la infección de estos hongos (González Montaner y Di Nápoli 2002). Al oeste de la región Pampeana por cada día que se demora la siembra después del 10 de octubre el rendimiento disminuye 15 kg/ha (Duarte 2002).

Se considera que 8TF y 10TF son recursos fitogenéticos valiosos que podrían utilizarse en el mejoramiento de la capacidad de desarrollo bajo temperaturas subóptimas durante la implantación de cultivares comerciales que se utilicen en siembras tempranas.

En las poblaciones RUD el efecto negativo del déficit hídrico en la etapa reproductiva (Capítulo 2) fue diferente según el material vegetal. Entre las RUD, RIV fue la población con mayor resistencia al déficit hídrico impuesto.

En Argentina el déficit hídrico es la principal causa de la baja productividad del cultivo de girasol (Aguirrezabal 2003). Entre las zonas productivas de girasol, el oeste de la región pampeana es la más afectada por este fenómeno meteorológico (Funaro *et al.* 2008), que generalmente comienza alrededor de los 50 días desde la siembra y aumenta

a medida que avanza la temporada (Quiroga *et al.* 2008). En esta zona, el déficit hídrico principalmente afecta las fases del desarrollo que comprenden el estado reproductivo del girasol (Trápani *et al.* 2003).

En RIV la estructura vegetativa, reproductiva y el rendimiento de la planta disminuyó moderadamente bajo déficit hídrico impuesto en diferentes etapas del desarrollo reproductivo. Los rasgos observados en esta población ruderal que probablemente hayan contribuido con la mejor performance reproductiva bajo déficit hídrico fueron reducción moderada de la superficie foliar y la altura, reducción leve del diámetro del vástago principal, capacidad de mantener el abastecimiento de agua desde el suelo hacia la planta, buen contenido de agua en los tejidos, capacidad de controlar la pérdida de agua desde los tejidos foliares, mantenimiento del verdor foliar, capacidad para mantener el número de primordios florales formados por capítulo, preservación de la fertilidad, reducción leve del número de granos formados y preservación de la biomasa de las cipselas formadas.

Una vez que el cultivo de girasol se ha establecido, el déficit hídrico en la etapa reproductiva posee potencialmente la mayor capacidad para reducir el rendimiento (Aguirrezabal y Andrade 2002). Las reducciones en el rendimiento pueden ser mayores al 50% dependiendo del período afectado, la severidad y duración del estrés, y el genotipo afectado (Göksoy *et al.* 2004; Nazariyan *et al.* 2009; Ghafarri *et al.* 2012). El potencial de rendimiento en grano de los cultivares comerciales de girasol argentinos es de entre 4500-5000 kg por hectárea (Aguirrezabal y Andrade 2002). Sin embargo en la zona oeste de la región pampeana el rendimiento promedio no supera los 2500 kg por hectárea. Principalmente debido a que la producción está limitada por la disponibilidad de agua durante el ciclo del cultivo (Mercau *et al.* 2001, Duarte 2002). Además de un adecuado manejo del cultivo que asegure una buena provisión hídrica, se debe considerar la utilización de genotipos con mayor grado de resistencia al déficit hídrico (Dardanelli *et al.* 2003).

RIV podría aportar rasgos asociados a la resistencia al déficit hídrico que podrían contribuir con el aumento de la performance del girasol cultivado en zonas de deficiencias hídricas.

El cruzamiento de la fuente de resistencia S10 con las líneas endocriadas A09 y B09 (Capítulo 3) condujo a la generación de germoplasmas resistentes a SuCMoV-C sin segregación fenotípica para el carácter de resistencia.

En Argentina la incidencia de SuCMoV-C no es elevada, sin embargo se han observado lotes en las provincias de Entre Ríos, Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires afectados por esta virosis (Muñoz *et al.* 1980, Lenardon 1994, Pérez Fernández 2002). Este virus puede disminuir más del 50% el rendimiento si la infección sucede antes de la aparición de la octava hoja en híbridos susceptibles (Lenardon *et al.* 2001). En las zonas donde el riesgo potencial de infección por SuCMoV-C es alto el desarrollo de cultivares resistentes permitiría un manejo simple, económico y sustentable de las infestaciones naturales (Agrios 2005).

En esta tesis se conformaron cuatro stocks genéticos completamente resistentes a SuCMoV-C, SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3 y SuCMoV-C.4, después de dos ciclos de selección por resistencia a SuCMoV-C con alto grado de autofecundación. A partir de estos germoplasmas el INTA Manfredi está desarrollando líneas de girasol resistentes a SuCMoV-C (comunicación personal Álvarez Daniel-Mejorador Girasol INTA Manfredi).

La composición del perfil ácido de la población RUD DIA (Capítulo 4) presentó valores relativamente altos de concentración de ácido palmítico, esteárico y linoleico, y relativamente bajos de oleico en el aceite de sus granos.

Los cruzamientos con DIA aportaron gran variabilidad al contenido de ácidos grasos de los granos. Además el retrocruzamiento con DIA aumentó el contenido de ácido palmítico y esteárico en la descendencia. En los cruzamientos con DIA se identificaron individuos con perfiles ácidos peculiares. Un individuo del BC1F2 tuvo 87,6 g/kg de ácido palmítico, mientras que otro individuo tuvo 73,4 g/kg de ácido esteárico. Estos valores de ácido palmítico y esteárico son superiores a los observados en las variedades cultivadas (Bervillé 2010), aunque no fueron en magnitud tan significativos como aquellos obtenidos mediante mutagénesis, superior a 200 g/kg de aceite (Fernández Martínez *et al.* 1997; Pérez Vich *et al.* 1999 a, b, 2002 a, 2004; Velasco *et al.* 2008). Otro individuo de este retrocruzamiento tuvo 534 g/kg de ácido oleico, similar valor a los cultivares medio oleico disponibles en el mercado (Burton *et al.* 2004). En la

F3(B09xDIA) un individuo presentó 784 g/kg de ácido linoleico, similar valor a líneas endocriadas alto linoleico.

En los últimos años ha habido un cambio del mercado de girasol que ha aumentado la demanda de híbridos con calidad de aceite modificada para satisfacer las necesidades de los consumidores e industrias. Por ejemplo la producción de híbridos medio y alto oleico, principalmente adecuados para cocción a altas temperaturas, está muy difundida en EUA y ha ido aumentando en Europa (Labalette *et al.* 2012) y Argentina (ASAGIR 2016). Otros que combinan alto contenido de ácido esteárico y oleico, principalmente adecuados para la fabricación de margarinas sin ácidos grasos *trans*, y bajo saturado y medio o alto oleico, que aumentan las propiedades nutricionales, están cerca de ser comercializados (Velasco *et al.* 2012).

La alta variabilidad de perfiles acídicos observada en los cruzamientos con DIA y el aumento del contenido de ácidos grasos saturados en los retrocruzamientos con DIA indicaría una fuente de genes interesante para incorporar en programas de mejoramiento de calidad de aceite de girasol.

Los stocks genéticos que presentaron rasgos de interés para la mejora del girasol han sido depositadas en el Banco Activo de Germoplasma del INTA Manfredi. Las Psel 8TF y 10TF fueron registradas bajo denominación CGGI1355 y CGGI1356, respectivamente; la población RIV con tres ciclos de fecundación selectiva se registró bajo la denominación CGGI1357; los cuatro stocks resistentes a SuCMoV-C, SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3, SuCMoV-C.4 fueron registrados bajo la denominación CGGI1351, CGGI1352, CGGI1353 y CGGI1354, respectivamente; y los stocks genéticos F3(B09xDIA) y F2(B09xDIA)casxDIA que presentaron individuos con perfiles acídicos peculiares fueron registrados bajo denominación CGGI1358 y CGGI1359, respectivamente. A través de ese Banco, se encuentran fácilmente disponibles para la utilización en programas de mejoramiento.

Los stocks genéticos tolerantes a temperaturas subóptimas 8TF y 10TF (SG:TF), SuCMoV-C.1, SuCMoV-C.2, SuCMoV-C.3, SuCMoV-C.4 (SG: SuCMoV-C), BC1F2(A09xDIA) y F3(B09xDIA) (SG:ACEITE) tuvieron características intermedias entre girasol de tipo silvestre y cultivado. Algunas de las característica que los distinguen son: altura moderada a baja, presencia de capítulo principal, baja cantidad de capítulos

secundarios, moderado porcentaje de autofecundación y biomasa de mil cipselas superior a 12 g. Los rasgos indeseados que presentaron algunas de estas líneas fueron: la alta susceptibilidad a *Verticillium* y ramificaciones laterales. Entre los SG:SuCMoV, el SuCMoV-C.4 presentó las características fenotípicas más deseables para su utilización como donante de resistencia a SuCMoV-C. El tamaño y biomasa de las cipselas de los SG:ACEITE fue similar a la observada en los cultivares de girasol que se utilizan para la producción de aceite. En estos germoplasmas queda pendiente la caracterización fenotípica a nivel de planta. El stock genético RIV-FS presentó un fenotipo similar a la población ruderal de origen; la altura de planta fue mayor a 2 m, antocianas en tallos y pecíolos, ramificaciones distribuidas sobre todo el largo del vástago principal, numerosos capítulos de tamaño pequeño y cipselas pequeñas.

Cuando germoplasmas con rasgos silvestres son utilizadas en programas de mejoramiento, puede existir la introgresión de rasgos indeseables hacia el genotipo cultivado junto con el carácter deseado. No obstante estos rasgos indeseados pueden ser eliminados mediante la selección en su contra (Acquaah 2012). Los stocks genéticos aquí mencionados, salvo RIV-FS, presentaron algunos rasgos de domesticación que facilitarían su utilización como recursos genéticos.

# REFERENCIAS



- Aapresid 2016. Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa. Evolución de la superficie en siembra directa en Argentina. Campañas 1977/78 a 2010/11. [http://www.aapresid.org.ar/wp-content/uploads/2013/02/aapresid.evolucion\\_superficie\\_sd\\_argentina.1977\\_a\\_2011.pdf](http://www.aapresid.org.ar/wp-content/uploads/2013/02/aapresid.evolucion_superficie_sd_argentina.1977_a_2011.pdf)
- Acquaah G. 2012. Principles of plant genetics and breeding. 1-740 p.
- Agrios G. 2005. Plant Pathology. 1-922 p.
- Agüera F., Villalobos F., Orgaz F. 1997. Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes differing in early vigour using a simulation model. European Journal of Agronomy 7:109-118.
- Aguirrezabal L. 2003. Causas fisiológicas y posibles soluciones de las variaciones de rendimiento y calidad del girasol. EEA Balcarce, INTA. <http://anterior.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/oleag/girasol/aguirreza.htm>
- Aguirrezabal L., Andrade F. 2002. Ecofisiología. En: Manual práctico para el cultivo de girasol. 27-50 p.
- Aguirrezabal L., Izquierdo N., Nolasco S., Dosio G. 2002. Calidad. En: Manual práctico para el cultivo de girasol. 213-240 p.
- Aguirrezabal L., Orioli G., Hernández L., Pereyra V., Miravé J. 1996. Girasol. Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. Unidad Integrada Balcarce. Buenos Aires. Argentina. 1-127 p.
- Aguirrezabal L., Tardieu F. 1996. An architectural analysis of the elongation of field-grown sunflower root systems. Elements for modelling the effects of temperature and intercepted radiation. Journal of Experimental Botany 47 ( 296): 411-420.
- Al Khatib K., Baumgartner J., Peterson D., Currie R. 1998. Imazethapir resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). Weed Science 46: 403-407.

- Alegre De La Soujeole A., Miller F. 1984. Cold tolerance of sorghum during early developmental stages. 39th Annual Corn and Sorghum Research Conference. Chicago. 18–32 p.
- Allen D., Ort D. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Plant Science* 6 (1).36-42
- Allinne C., Maury P., Sarrafi A., Grieu P. 2009. Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions. *Plant Science* 177: 349-359.
- Alvarez R., Steinbach H. 2009. A review of the effects of tillage system on some soil physical properties, water content, nitrate availability and crops yield in the Argentine Pampas. *Soil & Tillage Research* 104: 1-15.
- Alza J., Fernández Martínez J. 1997. Genetic analysis of yield and related traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in dryland and irrigated environments. *Euphytica* 95: 243-251.
- Andrade A., Riera N., Lindstrom L., Alemano S., Alvarez D., Abdala G., Vigliocco A. 2015. Pericarp anatomy and hormone profiles of cypselas in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. *Plant Biology* 27:351-360.
- Andrade F. 1995. Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. *Field Crops Research* 41 (1): 1–12.
- Andrade F., Aguirrezábal L., Rizzalli R. 2000. Crecimiento y rendimiento comparados. En: Bases para el manejo del maíz, girasol y la soja. 61-96 p.
- Andrade F., Cirilo A. 2000. Fecha de siembra y rendimiento de los cultivos. En: Bases para el manejo del maíz, girasol y la soja. 135-153 p.
- Andrade F., Sadras V. 2000. Efectos de la sequía sobre el crecimiento y rendimiento de los cultivos. En: Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja. 173-206 p.
- Andrade A., Vigliocco A., Alemano S., Llanes A., Abdala G. 2013. Comparative morpho-biochemical responses of sunflower lines sensitive and tolerant to water stress. *American Journal of Plant Science* 4: 156-167.

- AOCS-American Oil Chemists Society. 1998. Official methods and recommended practices of the American oil chemists society. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.
- ASAGIR-Asociación Argentina de Girasol. 2016. <http://www.asagir.org.ar>
- Ashraf M., Foolad M. 2005. Pre sowing seed treatment—A shot gun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and nonsaline conditions. *Advances in Agronomy* 88: 223–271.
- Baack E., Sapir Y., Chapman M, Burke J., Rieseberg L. 2008. Selection on domestication traits and quantitative trait loci in crop–wild sunflower hybrids. *Molecular Ecology* 17: 666–677.
- Báez J., Mácola T. 1954. Obtención de nuevas variedades e híbridos comerciales de girasol. *IDIA XXI* 73-75: 77.
- Bajehbaj A. 2010. The effects of NaCl priming on salt tolerance in sunflower germination and seedling grown under salinity conditions. *African Journal of Biotechnology* 9 (12): 1764-1770.
- Balešević Tubić S., Malenčić Đ., Tatić M., Miladinović, J. 2005. Influence of aging process on biochemical changes in sunflower seed. *Helia* 28 (42): 107-114.
- Barrosa J., de Carvalho M., Basch G. 2004. Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to sowing date and plant density under Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy* 21: 347–356.
- Baskin C., Baskin J. 2014. Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. 1-1586 p.
- Baskin J., Baskin C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1–16.
- Bazin J., Batlla D., Dussert S., El Maarouf Bouteau H., Bailly C. 2011. Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *Journal of Experimental Botany* 62 (2): 627–640.

- BCBA-Bolsa de Cereales de Buenos Aires. 2016. Relevamiento de tecnología agrícola aplicada de la Bolsa de Cereales. Campaña 2010/2011. <http://www.bolsadecereales.com/descargar-documento1-96/retaa-ccba1420751a5c5cba2d8b71e00ecf1f>
- Bejerman N., Giolitti F., Lenardon S. 2008. Molecular characterization of a novel *Sunflower chlorotic mottle virus* (SuCMoV) strain. 17th International Sunflower Conference, Córdoba, España. 137-142 p.
- Bertero de Romano A., Vázquez A. 2003. Origin of the argentine sunflower varieties. *Helia* 26(38):127-136.
- Bertin P., Kinet J., Bouharmont J. 1996. Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. *Euphytica* 89 (2): 201-210
- Bervillé A. 2010. Oil composition variations. En: Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower. 253-279 p.
- Bianco J., Garelo G., Le Page Degivry M. 1994. Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. *Seed Science Research* 4 (2): 57-62.
- Blum A. 2011. Plant breeding for water-limited environments. 1-255 pp.
- Blum A. 2016 a. Stress, strain, signaling, and adaptation – not just a matter of definition. *Journal of Experimental Botany* 67 (3): 563–566.
- Blum A. 2016 b. The mitigation of drought stress. Mitigation by crop drought resistant. <http://www.plantstress.com/Articles/index.asp>
- Bodrone P., Batlla D., Rodríguez V., Arisnabarreta S. 2012. The effect of maternal environment on sunflower (*Helianthus annuus*) achenes dormancy level at harvest: the thermal environment. 18 th International Sunflower Confernece. 372-377 p.
- Brunick R. 2007. Seed dormancy in domesticated and wild sunflower (*Helianthus annuus* L.): type, longevity and QTL discovery. Tesis de doctorado. Oregon

- State University. 1-122 p.  
[https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=maDWEbCFE4cC&oi=fnd&pg=PA1&dq=++helianthus+annuus+DORMAncy&ots=eP5TDi\\_sqo&sig=dPLMHm1TQ\\_bIoKd8i5O57a3-WM8#v=onepage&q=helianthus%20annuus%20DORMAncy&f=false](https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=maDWEbCFE4cC&oi=fnd&pg=PA1&dq=++helianthus+annuus+DORMAncy&ots=eP5TDi_sqo&sig=dPLMHm1TQ_bIoKd8i5O57a3-WM8#v=onepage&q=helianthus%20annuus%20DORMAncy&f=false)
- Burkart R., Bárbaro N., Sanchez R., Gómez D. 1999. Eco-regiones de La Argentina. Administración de Parques Nacionales, Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sostenible, Presidencia de la Nación, Buenos Aires, Argentina. 1-42 p.
- Burke J., Knapp S., Rieseberg L. 2005. Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. *Genetics* 171: 1933-1940.
- Burke J., Tang S., Knapp S., Rieseberg L. 2002. Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 161: 1257-1267.
- Burton J., Miller J., Vick B., Scarth R., Holbrook C. 2004. Altering fatty acid composition in oil seed crops. *Advances in Agronomy* 84: 273-306.
- Calzada J. 2014. Firme consumo mundial de aceites vegetales 2014/2015. Informativo semanal. Bolsa de Comercio de Rosario. [http://www.bcr.com.ar/Publicaciones/Informativo%20semanal/bcr2014\\_10\\_24.pdf](http://www.bcr.com.ar/Publicaciones/Informativo%20semanal/bcr2014_10_24.pdf)
- Campos P., Quarrtin V., Ramalho J., Nunes M. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea sp.* plants. *Journal of Plant Physiology* 160:283-292.
- Cantamutto M. 2008 a. Agronomic study of two annual *Helianthus* species naturalized in Argentina as potential sunflower crop genetic resource. Tesis doctoral, Universitat de Lleida. 1-250 p.
- Cantamutto M., Alvarez D., Presotto A., Fernández Moroni I., Seiler G., Poverene M. 2008 b. Seed morphology and oil composition of wild *Helianthus annuus* from Argentina. 17th. International Sunflower Conference, Córdoba, Spain. 703 p.

- Cantamutto M., Lenardon S., Presotto P., Alvarez D., Fernández Moroni I., Giolitti F., Poverene M. 2010 a. The Argentine wild *Helianthus annuus* L. as a genetic resource for Sunflower Chlorotic Mottle Virus (SuCMoV) resistance. International Symposium “Sunflower Breeding on Resistance to Diseases”, Rusia.137-140 p.
- Cantamutto M., Poverene M., Peinemann N. 2008 c. Multi-scale analysis of two annual *Helianthus* species naturalization in Argentina. Agriculture Ecosystem Environment 123: 69-74.
- Cantamutto M., Poverene M., Presotto A., Alvarez D., Lenardon S., Rodríguez R., Martín Sánchez J., Fernández Moroni I., Giolitti F., Garayalde A., Haucke A., Bellido A., Fraysse M. 2010 b. The argentine wild *Helianthus annuus* L. genetic resource. Helia 33 (52): 47-62.
- Cantamutto M., Presotto A., Fernández Moroni I., Alvarez D., Poverene M., Seiler G. 2010 c. High infraspecific diversity of wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.) naturally developed in central Argentina. Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 205 (5): 306–312.
- Cantamutto M., Presotto A., Poverene M., Alvarez D., Rodríguez R., Lenardon S., Giolitti F., Martín Sánchez J. 2007 a. Valoración agronómica de poblaciones argentinas de *Helianthus annuus* y *H. petiolaris*. 4to Congreso Argentino de Girasol. ASAGIR. 317 p.
- Cantamutto M., Ureta S., Gutierrez A., Presotto A., Poverene M. 2007 b. Zonas híbridas entre especies silvestres de *Helianthus* en Argentina. 36° Congreso Argentino de Genética. BAG Vol. XVIII (Suplemento II): 192.
- Carapetian J., Knowles P. 1993. Genetic linkage between the trigenic male-female sterility and oil quality alleles in Safflower. Crop Science 33: 239-242.
- Chatterton J., Kadish A. 1969. A temperature gradient germinator. Agronomy Journal 61: 643-644.

- Chaves M., Pereira J., Maroco J., Rodrigues M., Ricardo C., Osório M., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C. 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89: 907-916.
- Chikkodi S., Ravikumar R. 2000. Influence of pollen selection for *Alternaria helianthi* resistance on the progeny performance against leaf blight in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Sex Plant Reproduction* 12: 222–226.
- Clarke H, Khan T., Siddique K. 2004. Pollen selection for chilling tolerance at hybridisation leads to improved chickpea cultivars. *Euphytica* 139: 65–74.
- Connor, D., Hall, A.J., 1997. Sunflower physiology. En: *Sunflower Technology and Production*. 113–182 p.
- Connor D., Sadras V. 1992. Physiology of yield expression in sunflower. *Field Crops Research*, 30(3-4): 333–389.
- Conte L., Leom O., Palmieri S., Capella P., Lercker C. 1989. Half-seed analysis: rapid chromatographic determination of the main fatty acids of sunflower. *Plant Breeding* 102: 158-165.
- Cook A., Valdes G., Lee H. 2006. Mulch effects on rainfall interception, soil physical characteristics and temperature under *Zea mays* L. *Soil & Tillage Research* 91: 227–235.
- Corbineau F., Bagniol S., Côme D. 1990. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed dormancy and its regulation by ethylene. *Israel Journal of Botany* 39: 313-325
- Corbineau F., Côme D. 2003. Germination of sunflower seed as related to ethylene synthesis and sensitivity - an overview. En: *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III*. 216-221 p.
- Cossani C., Pietragalla J., Reynolds M. 2012. Canopy temperature and plant water relations. En: *WHEAT: Physiological Breeding I: Interdisciplinary Approaches to Improve Crop Adaptation*. 60-68 pp.
- Cubero J. 2003. *Introducción a la mejora genética vegetal*. 1-567 p.

- Dardanelli J., Collino D., Otegui M., Sadras V. 2003. Bases funcionales para el manejo de agua en los sistemas de producción de los cultivos de granos. En: producción de granos. Bases funcionales para su manejo.
- de Fina A. 1992. Aptitud Agroclimática de la República Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Buenos Aires. 1-402 p.
- De Haro A., Fernández Martínez J. 1991. Evaluation of wild sunflower (*Helianthus*) species for high content and stability of linoleic acid in the seed oil. *Journal of Agricultural Science* 116: 359-367.
- de la Vega A., Delacy I., Chapman S. 2007. Changes in agronomic traits of sunflower hybrids over 20 years of breeding in central Argentina. *Field Crop Research* 100: 73–81.
- Di Renzo M., Bonamico N., Díaz D., Ibañez M., Faricelli M., Balzarini M., Salerno J. 2004. Microsatellite markers linked to QTL for resistance to Mal de Río Cuarto disease in *Zea mays* L. *The Journal of Agricultural Science* 142: 289-295.
- Di Rienzo J., Macchiavelli R., Casanoves F. 2012. Modelos Lineales Mixtos Aplicaciones en InfoStat. 1-248 pp.
- Díaz Zorita M., Duarte G., Plante Díaz Zorita E. 2003. El cultivo de girasol. ASAGIR-Asociación Argentina de Girasol. 1-10 p.
- Doebley J., Gaut B., Smith B. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309-1321.
- Domínguez Giménez J., Fick G. 1975. Fertility restoration of male-sterile cytoplasm in wild sunflowers. *Crop Science* 15: 724-726.
- Dosio G., Tardieu F., Turc O. 2006. How does the meristem of sunflower capitulum cope with tissue expansion and floret initiation? A quantitative analysis. *New Phytologist* 170: 711-722.
- Dosio G., Tardieu F., Turc O. 2011. Floret initiation, tissue expansion and carbon availability at the meristem of the sunflower capitulum as affected by water or light deficits. *New Phytologist* 189: 94–105.

- Downey R., Harvey B. 1963. Methods of breeding for oil quality in rape. *Canadian Journal of Plant Science* 43:271-275.
- drc package. Versión 2.3-96. 2013. Analysis of dose-response curve data. Desarrollado por Ritz C., Strebig J. <http://www.r-project.org>, <http://www.bioassay.dk>
- Duarte G. 2002. Modelos de producción en la región de la pampa arenosa. En: Manual práctico para el cultivo de girasol. 281-298 p.
- Dujovny G., Sasaya T., Koganesawa H., Usugi T., Shoara K, Lenardon S. 2000. Molecular characterization of a new potyvirus infecting sunflower. *Archives of Virology* 145: 2249-2258.
- Dujovny G., Usugi T., Shoara K, Lenardon S. 1998. Characterization of a potyvirus infecting sunflower in Argentina. *Plant Disease* 82 (5): 470-474.
- Egli D.1998. Seed biology and the yield of grain crops. 1-178 p.
- Escande A. 2000. Manejo de la sanidad. En: Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja. 371-406 p.
- FAO-Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FINUT-Fundación Iberoamericana de Nutrición. 2012. Resumen de las conclusiones y recomendaciones dietéticas sobre grasa total y ácidos grasos. En: Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos 9-20 p.
- Fernández Martínez J., Jiménez A., Domínguez J., García J., Garcés R., Mancha M. 1989. Genetic control of the high oleic content in cultivated sunflower. *Euphytica* 41: 39-51.
- Fernández Martínez J., Mancha M., Osorio J., Garcés R. 1997. Sunflower mutant containing high levels of palmitic acid in high oleic background. *Euphytica* 97: 113–116.
- Fernández Martínez J., Pérez Vich B., Velasco L., Domínguez J. 2007. Breeding for specialty oil types in sunflower. *Helia* 30 (46): 75-84.

- Fernández Martínez J., Velasco L., Pérez Vich B. 2006. Progress in the genetic modification of sunflower oil quality. 16th International Sunflower Conference, Fargo, ND USA. 1-14 p.  
<http://isasunflower.org/fileadmin/documents/aaProceedings/16thISCFargo-vol1/paper1-14.pdf>
- Fernández Moroni I. 2008. Caracterización morfológica de frutos de poblaciones argentinas de girasol silvestre (*Helianthus annuus* ssp. *annuus* L.) Trabajo de intensificación, Universidad Nacional del Sur. 1-57 p.
- Fernández A., Re J. 2004. Mejoramiento Genético del Girasol. En: El cultivo de girasol en siembra directa. 57-64 p.
- Fick G. 1978. Breeding and genetics. En: Sunflower science and technology. 279-338 p.
- Fick G., Miller J. 1997. Sunflower breeding. En: Sunflower technology and production. 395-440 p.
- Flexas J., Ribas Carbó M., Bota J., Galmés J., Henkle M., Martínez Cañellas S., Medrano H. 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytologist* 172: 73–82.
- Fonseca E. 1987. El desarrollo del cultivo. En: Producción de girasol. Cuadernillo de actualización técnica N° 40. Comisión de Girasol. Convenio AACREA-SPS.19-30 p.
- Foolad M., Lin G. 2001. Genetic analysis of cold tolerance during vegetative growth in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Euphytica* 122: 105–111.
- Foolad M., Lin G. 2000. Relationship between cold tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato: germplasm evaluation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125 (6): 679-683.
- Frazad P., Mohammad N., Hamid R., Hossein Z., Majid J. 2007. Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content and grain yield of wheat cultivars. *Journal of Biological Science* 7 (6): 841-847.

- Funaro D., Garay J., Rivarola R., Quiroga A. 2008. Algunos factores determinantes del rendimiento de girasol en la región semiárida pampeana central. En: El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana. INTA. Publicación Técnica 72: 27-32.
- Gandhi S., Heesacker A., Freeman C., Argyris J., Bradford K., Knapp S. 2005. The self-incompatibility locus (S) and quantitative trait loci for self-pollination and seed dormancy in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 619-629.
- Garayalde A., Presotto A., Carrera A., Poverene M., Cantamutto M. 2015. Characterization of a new male sterility source identified in an invasive biotype of *Helianthus annuus* (L.). *Euphytica* 206 (3): 579-595.
- Ghaffari M., Toorchi M., Valizadeh M., Shakiba M. 2012. Morpho-physiological screening of sunflower inbred lines under drought stress condition. *Turkish Journal of Field Crops* 17 (2):185-190.
- Ghobadi M., Taherabadi S., Ghobadi M., Mohammadi G., Jalali Honarmand S. 2013. Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress. *Industrial Crops and Products* 50: 29–38.
- Giolitti F. 2014. Enfermedades virales que afectan al cultivo de girasol en Argentina. 3er Congreso Argentino de Fitopatología. 148 pp. [http://aafitopatologos.com.ar/media/secciones/241\\_desc.pdf](http://aafitopatologos.com.ar/media/secciones/241_desc.pdf)
- Giordani T., Buti M., Natali L., Pugliesi C., Cattonaro F., Morgante M., Cavallini A. 2011. An analysis of sequence variability in eight genes putatively involved in drought response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical Applied Genetic* 122: 1039–1049.
- Göksoy A., Demir A., Turan Z., Dağüstü N. 2004. Responses of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to full and limited irrigation at different growth stages. *Field Crops Research* 87: 167–178.
- Golberg A., Ruiz M., Quiroga A., Fernández O. 2011. ¿Qué le sucede a un cultivo cuando no llueve?. Ediciones INTA. 1-93 p.

- Gómez P., Rodríguez Hernández A., Moury B., Aranda M. 2009. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. *European Journal of Plant Pathology* 125:1–22.
- González Belo R., Tognetti J., Benech Arnold R. 2014. Germination responses to temperature and water potential as affected by seed oil composition in sunflower. *Industrial Crops and Products* 62: 537-544.
- González J., Mancuso N., Alvarez D., Cordes D. 2014. Líneas realizadas en INTA con diferentes caracteres mejorados. Aportes del germoplasma argentino al mejoramiento del girasol. 6to Congreso Argentino de Girasol. ASAGIR. <http://www.asagir.org.ar/images/6tocongreso/murales/2014m11.pdf>
- González Montaner J., Di Napoli M. 2002. Sistemas de producción de girasol en la región húmeda argentina. En: Manual práctico para el cultivo de girasol. 269-280 p.
- González Montaner J., Di Napoli M. 2004. El ambiente edáfico para producir girasol en siembra directa. En: El cultivo de girasol en siembra directa. 51-54 p.
- González Montaner J., Therisod G., Di Napoli M. 2010. Región Mar y Sierras. En: Producción de Girasol. 64-68 pp.
- Gowda J., Seetharam A. 2008. Response to mass and  $S_I$  selection for autogamy, seed yield and oil content in sunflower populations (*Helianthus annuus* L.). *Helia* 31 (48): 101-110.
- Granier C., Tardieu F. 1998. Is thermal time adequate for expressing the effects of temperature on sunflower leaf development?. *Plant, Cell and Environment* 21: 695-703.
- Grime J. 2002. Stress-tolerators. En: Plant strategies, vegetation processes and ecosystem properties. 48-79 p.
- Gromadzka J., Wardenki W. 2011. Trends in edible vegetable oils analysis. Part A. Determination of different components of edible oils- a review. *Polish Journal of food and nutrition Science* 61 (1): 33-43.

- Gulya T., Marek L., Gavrilova V. 2010. Plenary: Disease resistance in cultivated sunflower derived from public germplasm collections. International Symposium "Sunflower Breeding on Resistance to Diseases", Krasnodar, Russia. 7-18 p.
- Gulya T., Rashid K., Masirevic S. 1997. Sunflower diseases. En: Sunflower technology and production. 263-380 p
- Gutierrez A., Carrera A., Basualdo J., Rodriguez R., Cantamutto M., Poverene M. 2010. Gene flow between cultivated sunflower and *Helianthus petiolaris* (Asteraceae). *Euphytica* 172 (1): 67-76.
- Hall A. 2001. Crop physiological responses to temperature and climatic zones. En: Crop responses to environment. 59-82 p.
- Hall A. 2007. Cultivos menos susceptibles a la sequía. ¿Dónde estamos en girasol?. 4to Congreso Argentino de Girasol. ASAGIR. [http://www.asagir.org.ar/asagir2008/pdf\\_dia\\_1/11-Cultivos%20menos%20susceptibles%20a%20la%20sequ%C3%ADa.pdf](http://www.asagir.org.ar/asagir2008/pdf_dia_1/11-Cultivos%20menos%20susceptibles%20a%20la%20sequ%C3%ADa.pdf)
- Hall A., Connor D., Whitfield D. 1989. Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water stressed sunflower crops. I. Estimates using labelled carbon. *Field Crops Research* 20: 95-112.
- Hall A., Sposaro M., Chimenti C. 2010. Stem lodging in sunflower: variations in stem failure moment of force and structure across crop population densities and post-anthesis developmental stages in two genotypes of contrasting susceptibility to lodging. *Field Crop Research* 116: 46-51.
- Hall A., Whitfield D., Connor D. 1992. Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water stressed sunflower crops. II. Estimates from a carbon budget. *Field Crops Research* 24: 273-294.
- Hanley M., Fenner M., Whibley H., Darvill B. 2004. Early plant growth: identifying the end point of the seedling phase. *New Phytologist* 163: 61-66.
- Harlan J. 1975. The dynamics of domestication. En: *Crops & Man*. 1-294 p.

- Harwood J. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1301: 7-56.
- Heidarvand L., Maali Amiri R. 2013. Physio-bioquematical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology* 170: 459-469.
- Heiser C. 1947. Hybridization between the sunflower species *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. *Evolution* 1 (4): 249-262.
- Heiser C. 1978. Taxonomy of *Helianthus* and origin of domesticated sunflower. En *Sunflower science and technology*. 1-505 p.
- Heiser C. 1998. The domesticated sunflower in old Mexico? *Genetic Resources and Crop Evolution* 45:447-449.
- Hernandez L., Green P. 1993. Transductions for the expression of pattern: analysis in sunflower. *The Plant Cell* 5: 1725-1738.
- Hernández L., Paoloni P. 1998. Germinación y emergencia de cuatro híbridos de girasol (*Helianthus annuus* L.) con diferente contenido lipídico y en relación con la temperatura. *Investigación agraria: Producción y Protección Vegetal* 13 (3):346-358.
- Hernández L., Paoloni P., Carrera A., Orioli G. 1995. Germinación de semillas de girasol a baja temperatura. *Primer Congreso Nacional de Soja y Segunda Reunión Nacional de Oleaginosos*, Pergamino, Argentina. 82-86 p.
- Hierro J., Maron J., Callaway R. 2005. A biogeographical approach to plant invasions: the importance of studying exotics in their introduced and native range. *Journal of Ecology* 93: 5-15.
- Hocking P., Steer B. 1989. Effects of seed size, cotyledon removal and nitrogen stress on growth and on yield components of oilseed sunflower. *Field Crops Research* 22 (1): 59-75.
- Hormaza J., Herrero M. 1992. Pollen selection. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 663-672.

- Hormaza J., Herrero M. 1996. Male gametophytic selection as a plant breeding tool. *Scientia Horticulturae* 65: 321-333.
- Hund A., Fracheboud Y., Soldati A., Stamp P. 2008. Cold tolerance of maize seedlings as determined by root morphology and photosynthetic traits. *European Journal of Agronomy* 28: 178-185.
- Hund A., Frascaroli E., Leipner J., Jompuk C., Stamp P., Fracheboud Y. 2005. Cold tolerance of the photosynthetic apparatus: pleiotropic relationship between photosynthetic performance and specific leaf area of maize seedlings. *Molecular Breeding* 16: 321–331.
- InfoStat 2013. Software estadístico. Desarrollado por Di Rienzo J., Casanoves F., Balzarini M., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ingaramo J., Feoli C. 2008. La importancia del complejo girasol en la Argentina. En: El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana. Publicación técnica N° 72. EEA INTA Anguil. 1-12 p.
- Iriarte L . 2001. Fechas de siembra en girasol. Red agroeconómica de administración de recursos. CEI Barrow (MAGyAI-INTA). 2 p.
- ISTA- International Seed Testing Association. 2004. International rules for seed testing. Glattbrugg, Switzerland. 410 p.
- Jaleel C., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Al Juburi H., Somasundaran R., Panneerselvam R. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture & Biology* 11: 100-105.
- Jan C., Chandler J. 1985. Comparison of germination techniques for wild *Helianthus* seeds. *Crop Science* 25 (2): 356-358.
- Jan C., Gulya T. 2006 a. Registration of three virus resistant sunflower genetics stocks. *Crop Science* 46: 1834-35.

- Jan C., Gulya T. 2006 b. Registration of a sunflower germplasm resistant to rust, downy mildew and virus. *Crop Science* 46: 1828.
- Jan C., Seiler G. 2007. Sunflower. En: Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. *Oilseed crops* 4: 103-165.
- Jones H., Jones M. 1989. Introduction: some terminology and common mechanism. En: *Plants under stress*. 1-10 p.
- Kaiser W. 1987. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum* 71: 142-149.
- Kaya Y., Jovic S., Miladinovic D. 2012. Sunflower. En: *Technological Innovations in Major World Oil Crops*. 85-130 p.
- Khalifa F., Schneiter A., El Tayeb E. 2000. Temperature-germination responses of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *Helia* 23 (33): 97-104.
- Kinney A. 1994. Genetic modification of the storage lipids of plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5:144-151.
- Knezevic S., Streibig J., Ritz C. 2007. Utilizing R software package for dose response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology* 21: 840-848.
- Koval V. 2000. Male and female gametophyte selection of barley for salt tolerance. *Hereditas* 132 (1): 1-5.
- Kozar J., Aiken R., Flerchinger G., Nielsen D., Ma L., Ahuja L. 2007. Comparison of modelling approaches to qualify residue architecture effects on soil temperature and water. *Soil and Tillage Research* 95 (1-2): 84-96.
- Labalette F., Jouffret P., Merrien A. 2012. Oleic sunflower production: current situation and trend for the future. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina.  
[http://isasunflower.org/fileadmin/documents/aaProceedings/18thISAArgentina-vol1/Markets/Oleic\\_Sunflower\\_production.\\_Current\\_situation\\_and\\_trends..pdf](http://isasunflower.org/fileadmin/documents/aaProceedings/18thISAArgentina-vol1/Markets/Oleic_Sunflower_production._Current_situation_and_trends..pdf)
- Lambers H., Chapin III F., Pons T. 2008. *Plant Physiological Ecology*. 1-604 p.

- Lange A. 2012. Sunflower no-till planting: Difficulties and solutions. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina. 130 -135 p.
- Le Page Degivry M., Barthe M., Garello G. 1990. Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus* embryo dormancy. *Plant Physiology* 92: 1164-1168.
- Le Page Degivry M., Garello G. 1992. In situ abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology* 98:1386-1390.
- Lenardon S. 1994. Síntomas de etiología viral en cultivos de girasol. En: Enfermedades del girasol en la Argentina. 99–103 p.
- Lenardon S., Bazzalo M., Abratti G., Cimmino C., Galella M., Grondona M., Giolitti F., León A. 2005. Screening sunflower for resistance to *Sunflower chlorotic mottle virus* and mapping the Rcmo-1 resistance gene. *Crop Science* 45:735–739.
- Lenardon S., Giolitti F., León A., Bazzalo M., Grondona M. 2001. Effect of *Sunflower chlorotic mottle virus* infection on sunflower yield parameters. *Helia* 24 (35): 55-66.
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Volumen II. Water, Radiation, Salt, and Other Stresses. 1-607 p.
- Littlejohns D., Tanner J. 1976. Preliminary studies on the cold tolerance of soybean seedlings. *Canadian Journal of Plant Science* 56:371-375.
- Liu F., Stützel H. 2004. Biomass partitioning, specific leaf area, and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress. *Scientia Horticulturae* 102:15–27.
- Liu J., Zhang F., Zhou J., Chen F., Wang B., Xie X. 2012. Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 78: 289–300.

- Liu W., Yu K., He T., Li F., Zhang D., Liu J. 2013. The low temperature induced physiological responses of *Avena nuda* L., a cold-tolerant plant species. *The Scientific World Journal* 2013: 1-7.
- López Pereira M., Rondanini D., Trápani N. 2006. Girasol. En: *Cultivos Industriales*. 145-182 p.
- López Urrea R., Montoro A., Trout T. 2014. Consumptive water use and crop coefficients of irrigated sunflower. *Irrigation Science* 32: 99-109.
- Maggiore A., Gardiol J., Irigoyen A. 2000. Requerimientos hídricos. En: *Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja*. 155-171 p.
- Mahajan S., Tuteja N. 2005. Cold salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.
- Maiti R., Vidyasagar P., Shahapur S., Seiler G. 2006. Studies on genotypic variability and seed dormancy in sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.). *Indian Journal of Crop Science* 1(1-2): 84-87.
- Manavalan L., Nguyen H. 2012. Drought tolerance in crops: physiology to genomics. En: *Plant stress physiology*. 1-23 p.
- Manivannan P., Abdul Jaleel C., Sankar B., Kishorekumar A., Somasundaram R., Lakshmanan G., Panneerselvam R. 2007. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59: 141–149.
- Marc J., Palmer J. 1976. Relationship between water potential and leaf and inflorescence initiation in *Helianthus annuus*. *Physiologia Plantarum* 36: 101-104.
- Marc J., Palmer J. 1981. Photoperiodic sensitivity of inflorescence initiation and development in sunflower. *Field Crop Research* 4: 155-164.
- Martínez Noël G., Dosio G., Puebla A., Insani E., Tognetti J. 2015. Sunflower: a potencial fructan-bearing crop?. *Frontiers in Plant Science* 6, artículo 798: 1-6.

- Maule A., Caranta C., Boulton M. 2007. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology* 8 (2): 223-31.
- Medrano H., Flexas J. 2003 a. Relaciones hídricas de las plantas. En: *La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis*. 1141-1182 p.
- Medrano H., Flexas J. 2003 b. Respuesta de las plantas al estrés hídrico. En: *La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis*. 253-286 p.
- Mehri N., Fotovat R., Saba J., Jabbari F. 2009. Variation of stomata dimensions and densities in tolerant and susceptible wheat cultivars under drought stress. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7(1): 167-170.
- Mehrpouyan M., Nazari Golshanb A., Sayfzadea S. 2010. Effect of irrigation stop at different growth stages on some agronomic traits of sunflower (*Helianthus annuus*) under three plant densities in Takestan Region, Iran. *Plant Ecophysiology* 2: 137-144.
- Melchinger A., Kuntze L., Gumber R., Lübberstedt T., Fuchs E. 1998. Genetics basis of resistance to sugarcane mosaic virus in European maize germplasm. 96: 1151-1161.
- Melgarejo M. 2003. Girasol, usos, semilla, aceite, pellets, nutrición. Cuadernillo informativo N° 3. Asociación Argentina de Girasol. 1-37 p. [http://www.asagir.org.ar/asagir2008/archivos\\_arcp/200884143429.pdf](http://www.asagir.org.ar/asagir2008/archivos_arcp/200884143429.pdf)
- Mercau J., Sadras V., Satorre E., Messina C., Balbi C., Uribelarrea M., Hall A. 2001. On-farm assessment of regional and seasonal variation in sunflower yield in Argentina. *Agricultural Systems* 67(2): 83-103.
- Mercer K., Shaw R., Wyse D. 2006. Increased germination of diverse crop-wild hybrid sunflower seeds. *Ecological Applications* 16 (3): 845-854.
- Messmer R., Fracheboud Y., Bänziger M., Stamp P. Ribaut J. 2011. Drought stress and tropical maize: QTLs for leaf greenness, plant senescence, and root capacitance. *Field Crops Research* 124(1): 93-103.

- Miller J., Zimmerman D., Vick B. 1987. Genetic control of high oleic acid content in sunflower oil. *Crop Science* 27: 923-926.
- Miller J., Fick G. 1997. Genetics of sunflower. En: *Sunflower Technology and Production*. 441-495 p.
- Miller J., Vick. 1999. Inheritance of reduce stearic and palmitic acid content in sunflower seed oil. *Crop Science* 39: 64-367.
- MINAGRI-Ministerio de Agroindustria, de la nación Argentina. 2016. Producción de girasol 2011-12. [http://www.minagri.gob.ar/site/areas/tierras/02\\_datos\\_geoedaficos/10\\_Uso%20del%20suelo/\\_archivos1/070000\\_Girasol/070000\\_Girasol.pdf](http://www.minagri.gob.ar/site/areas/tierras/02_datos_geoedaficos/10_Uso%20del%20suelo/_archivos1/070000_Girasol/070000_Girasol.pdf)
- Mock J., McNeill M. 1979. Cold tolerance of maize inbred lines adapted to various latitudes in North America. *Crop Science* 19 (2): 239-242.
- Mrdja J., Crnobarac J., Radić V., Miklič V. 2012. Sunflower seed quality and yield in relation to environmental conditions of production region. *Helia* 35 (57):123-134
- Muchow R., Sinclair T. 1989. Epidermal conductance, stomatal density and stomatal size among genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant, Cell and Environment* 12: 425-431.
- Muñoz J., Giorda L., Teyssandier E., Lenardon S. 1980. Una virosis del girasol (*Helianthus annuus* L.) en la República Argentina. IX International Conference of Sunflower. Torremolino-Málaga, España. 271-274 p.
- Murcia M., del Longo O, Argüello J, Perez A., Peretti A. 2006. Evaluación del crecimiento de plántulas de cultivares de girasol con diferentes proporciones de ácidos oleico/linoleico en respuesta a la baja temperatura. *Revista Brasileira de Sementes* 28 (2): 95-101.
- Murcia M., Peretti A., San Martino S., Pereyra V. 2001. Vigor de semillas y emergencia a campo de girasol (*Helianthus annuus* L.) en siembras anticipadas en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Revista Brasileira de Sementes*. 23(2): 263-267.

- Naumann M., Madariaga M. 2003. Atlas Argentino/Argentinatlas. Programa de Acción Nacional de Lucha Contra la Desertificación. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit. 1-94 p.
- Nazariyan G., Mehrpooyan M., Khiyavi M. 2009. Study of effects of drought stress on yield and yield components of four sunflower cultivars in Zanjan, Iran. *Plant Ecophysiology* 3:135-139.
- Núñez Colín C., Escobedo López D. 2014. Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta Agrícola y Pecuaria* 1(1): 1-6.
- Pallavi H., Rame G., Shadakshari Y., Vishwanath K. 2010. Study on occurrence and safe removal of dormancy in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Research Journal of Agricultural Sciences* 1(4): 341-344.
- Panković D., Sakač Z., Kevreš S., Plesničar M. 1999. Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of Experimental Botany* 50 (330): 127–138.
- Patil B., Salimath P., Ravikumar R. 2002. Standarization of *in vitro* pollen screening for osmotic stress in sorghum. En: *Plant physiology: characteristics, breeding and genetics*. 185-192 p.
- Pereira da Cruz R., Kothe Milach S., Federizzi L. 2006. Inheritance of rice cold tolerance at the germination stage. *Genetics and Molecular Biology* 29(2): 314-320.
- Pereyra V., Feoli C., Sarlangue H. 2001. Girasol en siembra directa. Cuadernillo Técnico N° 1. ASAGIR-INTA. 1-24 p.
- Pereyra Irujo G., Velázquez L., Lechner L., Aguirrezábal L. 2008. Genetic variability for leaf growth rate and duration under water deficit in sunflower: analysis of responses at cell, organ, and plant level. *Journal of Experimental Botany* 59 (8): 2221-2232.

- Pérez Fernández J. 2002. Enfermedades: Identificación y manejo. En: Manual práctico para el cultivo de girasol. 142-152 p.
- Pérez Fernández J., Figueruelo A. 2008. Enfermedades: identificación y manejo. En: El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana. INTA. Publicación técnica N° 72: 65-76.
- Pérez Vich B., Fernández J., Garcés R., Fernández Martínez J. 1999 a. Inheritance of high palmitic acid content in the seed oil of sunflower mutant CAS-5. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 496–501.
- Pérez Vich B., Garcés R., Fernández Martínez J. 1999 b. Genetic control of high stearic acid content in the seed oil of the sunflower mutant CAS-3. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 663–669.
- Pérez Vich B., Garcés R., Fernández Martínez J. 2000. Epistatic interaction among loci controlling the palmitic and the stearic acid levels in the seed oil sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 105-111.
- Pérez Vich B., Garcés R., Fernández Martínez J. 2002 a. Inheritance of high palmitic acid and its relationship with high oleic acid content in the sunflower mutant CAS 12. *Plant Breeding* 121: 49-56.
- Pérez Vich B., Muñoz Ruz J., Fernández-Martínez J. 2004. Developing mid-stearic acid sunflower lines from a high stearic acid mutant. *Crop Science* 44: 70-75.
- Pérez Vich B., Fernández Martínez J., Grondona M., Knapp S., Berry S. 2002 b. Stearoyl-ACP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying high stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 104:338–349.
- Poormohammad Kiani S., Grieu P., Maury P., Hewezi T., Gentzbittel L., Sarrafi A. 2007. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 193: 114-207.

- Poormohammad Kiani S., Sarrafi A. 2010. Molecular mapping of complex traits. En: Genetics, genomics and breeding of sunflower. 135-172 p.
- Pou A., Flexas J., Alsina M., Bota J., Carambula C., de Herralde F., Galmés J., Lovisoloc C., Jiménez M., Ribas Carbó M., Rusjan D., Secchic F., Tomás M., Zsófi Z., Medrano H. 2008. Adjustments of water use efficiency by stomatal regulation during drought and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). *Physiologia Plantarum* 134 (2): 313–323.
- Poverene M., Cantamutto M., Carrera A., Ureta M., Salaberry M., Echeverria M., Rodriguez R. 2002. El girasol silvestre (*Helianthus* spp.) en la Argentina: caracterización para la liberación de cultivares transgénicos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 31 (2): 97-116.
- Poverene M., Cantamutto M., Seiler G. 2009. Ecological characterization of wild *Helianthus annuus* and *Helianthus petiolaris* germplasm in Argentina. *Plant Genetic Resources* 7 (1): 42-49.
- Poverene M., Carrera A., Ureta S., Cantamutto M. 2004. Wild *Helianthus* species and wild-sunflower hybridization in Argentina. *Helia* 27 (40): 133-142.
- Presotto A. 2004. Caracterización morfológica y fenológica de poblaciones argentinas de girasol silvestre (*Helianthus annuus annuus* L.). Trabajo de intensificación, Universidad Nacional del Sur. 1-41 p.
- Presotto A. 2007. Caracterización fenotípica de poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* naturalizadas en Argentina. Tesis de Magister en Ciencias Agrarias. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. 1-77 p.
- Presotto A., Cantamutto M., Poverene M., Seiler G. 2009. Phenotypic diversity in wild *Helianthus annuus* from Argentina. *Helia* 32 (50): 37-50.
- Presotto A., Fernández Moroni I., Poverene M., Cantamutto M. 2011. Sunflower crop-wild hybrids: Identification and risks. *Crop Protection* 30: 611-616.

- Presotto A., Poverene M., Cantamutto M. 2014. Seed dormancy and hybridization effect of the invasive species, *Helianthus annuus*. *Annals of Applied Biology* 164: 373–383.
- Putt E. 1978. History and present world status. En: *Sunflower Science and Technology*. 1-30 p.
- Putt E., Carson R. 1969. Variation in composition of sunflower oil from composite samples and single seeds of varieties and inbred lines. *Journal of the American Oil Chemists Society* 46 (3):126-129.
- Putt E., Sackston W. 1957. Studies on rust. I. Some sources of rust resistance. *Canadian Journal Plant Science* 37: 43-54.
- Quiroga A., Fernández R., Frasier I., Funaro D. 2008. Aspectos del manejo del agua. En: *El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana*. INTA. Publicación Técnica 72: 33-38.
- R: A language and environment computing. 2013. R Core Team. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Radford B. 1977. Influence of size of achenes sown and depth of sowing on growth and yield of dryland oilseed sunflowers (*Helianthus annuus*) on the Darling Downs. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 17 (86): 489-494.
- Rauf S. 2008. Breeding sunflower for drought tolerance. *Communications in Biometry and Crop Science* 3 (1): 29-44.
- Raventos M. 1985. La siembra. En: *El girasol. Síntesis técnica actual de su cultivo*. Coordinador Sales E.G. N°1. extraordinario. Instituto Técnico Agrícola y Ganadero Aragón. 18-21 p.
- Ravikumar R., Patil B., Salimath P. 2003. Drought tolerance in sorghum by pollen selection using osmotic stress. *Euphytica* 133: 371–376.

- Ravikumar R., Patil B., Soregaon C., Hegde S. 2007. Genetic evidence for gametophytic selection of wilt resistant alleles in chickpea. *Theoretical Applied Genetic* 114: 619-625.
- Rawson H., Hindmarsh J. 1982. Effects of temperature on leaf expansion in sunflower. *Australian Journal of Plant Physiology* 9 (2): 209-219.
- Reigosa M., Pedrol N. 2003. La ecofisiología vegetal. En: *La Ecofisiología Vegetal: una ciencia de síntesis*. 1-57 p.
- Revers F., Le Gall O., Candresse T., Maule A. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12 (5): 367–376.
- Richardson A., Duigan S., Berlyn G. 2002. An evaluation of non invasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153: 185–194.
- Rieseberg L., Whitton J., Gardner K. 1999. Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics* 152 (2): 713-727.
- Rogers C. 1992. Insect pest and strategies for their management in cultivated sunflower. *Field Crop Research* 30: 301-332.
- Rong Hual L., Pei Pol G., Baumz M., Grand S., Ceccarelli S. 2006. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China* 5 (10): 751-757.
- Roselló P., Vigliocco A., Andrade A., Riera N., Calafat M., Molas M., Alemano S. 2016. Differential hormonal and gene expression dynamics in two inbred sunflower lines with contrasting dormancy level. *Plant Physiology and Biochemistry* 102: 133-140.
- Rossi E., Borghi M., Di Renzo M., Bonamico M. 2015. Quantitative trait *loci* (QTL) identification for resistance to Mal de Río Cuarto virus (MRCV) in maize based in segregate population. *The Open Agriculture Journal* 9: 48-55.
- Ruelland E., Collin S. 2012. Chilling stres. En: *Plant Stress Physiology*. 94-117 p.

- Ruelland E., Zachowski A. 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany* 69: 225–232.
- Ruiz M., Golberg A., Molas M. 2013. From seed to seedling: an ecophysiological point of view. En: *From seed germination to young plants. Ecology, growth and environmental influences.* 3-25 p.
- SAGPYA-Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. 1993. Resolución 2270. Tolerancia para semilla fiscalizada e identificada de cereales y oleaginosas. 1993. Resolución del Ministerio de Economía y Obras y Servicios Públicos; Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. En: [http://www.inase.gov.ar/index.php?option=com\\_remository&Itemid=102&func=fileinfo&id=562](http://www.inase.gov.ar/index.php?option=com_remository&Itemid=102&func=fileinfo&id=562)
- Sarkar S., Paramanick M., Goswami S. 2007. Soil temperature, water use and yield of yellow sarson (*Brassica napus* L. var *glauca*) in relation to tillage intensity and mulch management under rainfed lowland ecosystem in eastern India. *Soil & Tillage Research* 93:94-101.
- Schneiter A., Miller J. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Science* 21: 901-903.
- Seiler G. 1983. Effect of genotype, flowering date, and environment on oil content and oil quality of oil sunflower seed. *Crop Science* 23: 1063-1068.
- Seiler G. 1986. Analysis of the relationships of environmental factors with seed oil and fatty acid concentrations of wild annual sunflower. *Field Crops Research* 15: 57-72.
- Seiler G. 1992. Utilization of wild sunflower species for the improvement of cultivated sunflower. *Field Crops Research* 30: 195-230.
- Seiler G. 1997. Sunflower anatomy and morphology. En: *Sunflower technology and production.* 67-111 p.

- Seiler G. 1998. Seed maturity, storage time and temperature, and media treatment effects on germination of two wild sunflowers. *Agronomy Journal* 90 (2): 221-226.
- Seiler G. 2004. Wild *Helianthus annuus*, a potential source of reduced palmitic and stearic fatty acids in sunflower oil. *Helia* 27: 55-62.
- Seiler G. 2007. The potential of wild sunflower species for industrial uses. *Helia* 30: 157-198.
- Seiler G. 2010. Utilization of wild *Helianthus* species in breeding for disease resistance. Proceedings of the International Symposium “Sunflower Breeding on Resistance to Diseases”. Krasnodar, Russia. 36-50 p.
- Seiler G. 2012. Utilization of wild *Helianthus* species in sunflower breeding. En: Sunflower genetics and breeding. 355-430 p.
- Seiler G. 2015. Comparison of fatty acid composition of oil from original and regenerated populations of wild *Helianthus* species. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 13 (1):83–89.
- Seiler G., Jan C. 1994. New fertility restoration genes from wild sunflowers for sunflower PET1 male-sterile cytoplasm. *Crop Science* 34: 1526-1528.
- Seiler G., Jan C. 2010. Basic Information. En: Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower. 1-50 p.
- Seiler G., Rieseberg L. 1997. Systematics, origin, and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower. En: Sunflower Technology and Production. 21-65 p.
- Simpson B., McLeod C., George D. 1989. Selection for high linoleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Australian Journal of Experimental Agriculture* 29 (2): 233 - 239.
- SMN-Servicio Meteorológico Nacional. Boletines Agrometeorológicos Mensuales. 2016. <http://www.smn.gov.ar/serviciosclimaticos/?mod=agro&id=6>
- Škorić D. 2012 a. Sunflower breeding. En: Sunflower genetics and breeding. 245-354 p.

- Škorić D. 2012 b. The genetics of sunflower. En: Sunflower genetics and breeding. 1-165 p.
- Snow A., Moran Palma P., Riesenerg L., Wszelaki A., Seiler G. 1998. Fecundity, phenology, and seed dormancy of F1 wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). American Journal of Botany 85 (6):794-801.
- Snyder R., de Melo Abreu J. 2005. Frost damage: physiology and critical temperatures. En: Frost protection: fundamentals, practice, and economics. 67-90 p.
- Songsri P., Jogloy S., Holbrook C., Kesmala T., Vorasoot N., Akkasaeng C., Patanothai A. 2009. Association of root, specific leaf area and SPAD chlorophyll meter reading to water use efficiency of peanut under different available soil water. Agricultural Water Management 96: 790–798.
- Sthapit B., Witcombe J. 1998. Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule greening. Crop Science 38 (3): 660-665.
- Szemruch C., Renteria S., Moreira F., Cantamutto M., Ferrari L., Rondanini D. 2014. Germination, vigour and dormancy of sunflower seeds following chemical desiccation of female plants. Seed Science and Technology 42(3): 454-460.
- Tahir M., Imran N., Hussain M. 2002. Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines for drought tolerance. International Journal of Agriculture & Biology 4 (3): 398-400.
- Tahir M., Medhi S. 2001. Evaluation of open pollinated sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations under stress and normal conditions. International Journal of Agriculture & Biology 3 (2): 236-238.
- Taiz L., Zeiger E. 2010. Stress physiology. En: Plant Physiology. 591-623 p.
- Thompson T., Zimmerman D., Rogers C. 1981. Wild *Helianthus* as genetic resource. Field Crop Research 4: 333-343.
- Trápani N., López Pereira M., Sadras V., Hall A. 2003. Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en girasol. En: Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. 203.241 p.

- Trudgill D., Honek A., Li D., Van Straalen N. 2005. Thermal time—concepts and utility. *Annals of Applied Biology* 146:1–14.
- Trudgill D., Squire G., Thompson K. 2000. A thermal time basis for comparing the germination requirements of some British herbaceous plants. *New Phytology* 145: 107-114.
- Uemura M., Joseph R., Steponkus P. 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiology* 109:15-30.
- Unger P., Stewart B., Parr J., Singh R. 1991. Crop residue management and tillage methods for conserving soil and water in semi-arid regions. *Soil & Tillage Research* 20: 219-240.
- Ureta S., Carrera A., Cantamutto M., Poverene M. 2008. Gene flow among wild and cultivated sunflower, *Helianthus annuus* in Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 123: 343–349.
- Urie A. 1985. Inheritance of high oleic acid in sunflower. *Crop Science* 25: 986-989.
- USDA- United States Department of Agriculture. 2016. <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>.
- Vear F. 2010. Classic genetics and breeding. En: *Genetics, genomics and breeding of sunflower*. 51-77 p.
- Velasco L, Pérez Vich B., Fernández Martínez J. 2000. Inheritance of oleic acid content under controlled environment. 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France. A31–A36.
- Velasco L, Pérez Vich B., Fernández Martínez J. 2008. A new sunflower mutant with increased levels of palmitic acid in seed oil. *Helia* 31 (48): 55-60.
- Velasco L, Pérez Vich B., Fernández Martínez J. 2012. From the lab to the market: new challenges for sunflower oil quality research. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina. <http://isasunflower.org/fileadmin/documents/aaProceedings/18thISAArgentina->

vol1/From\_the\_lab\_to\_the\_market\_new\_challenges\_for\_sunflower\_oil\_quality\_research.pdf

- Venema J., Linger P., van Hausden A., van Hasselt P., Brüggermann W. 2005. The inheritance of chilling tolerance in tomato (*Lycopersicon* spp.). *Plant Biology* 7:118-130.
- Venema J., Posthumus F., Vries M., van Hasselt P. 1999. Differential response of domestic and wild *Lycopersicon* species to chilling under low light: growth, carbohydrate content, photosynthesis and the xanthophyll cycle. *Physiologia Plantarum* 105: 81-88.
- Verbist K., Santibañez F., Gabriels D., Soto G. 2010. Atlas de zonas áridas de América Latina y el Caribe. Programa hidrológico internacional de la UNESCO para América Latina y el Caribe. Documento Técnico 25. 1-48 p.
- Vick B., Jan C., Miller J. 2002. Inheritance of reduce saturated fatty acid content in sunflower oil. *Helia* 25: 113-122.
- Villalobos F., Ritchie J. 1992. The effect of temperature on leaf emergence rates of sunflower genotypes. *Field Crop Research*. 29:37-46.
- Visor GeoINTA. 2016. Suelos de la República Argentina. <http://geointa.inta.gov.ar/visor/>
- Vujaković M., Radic V., Miklić V., Jovičić D., Balešević Tubić S., Mrđa J., Škorić D. 2012. Seed dormancy of hybrids and parents lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* 35(56): 111-118.
- Weiss A., Primer S., Pace B., Mercer K. 2013. Maternal effects and embryo genetics: germination and dormancy of crop-wild sunflower hybrids. *Seed Science Research* 23 (4): 241-255.
- Willadino L., Camara T. 2003. Origen y naturaleza de los ambientes salinos. En: La ecofisiología vegetal. Una ciencia de síntesis. 303-330 p.
- Wills D., Burke J. 2007. Quantitative trait locus analysis of early domestication of sunflower. *Genetics* 176: 2589-2599.

- Wulff R. 1995. Environmental maternal effects on seed quality and germination. En: Seed development and germination. 491-505 p.
- Yoo C., Pence H., Hasegawa P., Mickelbart M. 2009. Regulation of transpiration to improve crop water use. *Critical Reviews in Plant Sciences* 28(6): 410-431.
- Yoo C., Pence H., Jin J., Miura K., Gosney M., Hasegawa P., Mickelbar M. 2010. The *Arabidopsis* GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of SDD1. *The Plant Cell* 22: 4128–4141.
- Yu H., Chen X., Hong Y., Wang Y., Xu P., Ke S., Liu H., Zhu J., Oliver D., Xianga C. 2008. Activated expression of an *Arabidopsis* HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *The Plant Cell* 20(4): 1134-1151.



# **ANEXO DE IMÁGENES**



**Imagen 1:** Plantas verdes con flores de la población de *H. annuus* ruderal Diamante después de la helada del 23 de abril de 2010, en el jardín común del CE-UNS.



**Imagen 2:** Cámara de crecimiento utilizada para realizar la selección de plantas tolerantes a temperaturas subóptimas durante germinación-V2.

a) Vista frontal. b) vista del interior. Se observan sobre los estantes bandejas multiceldas rellenas de sustrato.

a)



b)



**Imagen 3:** Vista del ensayo a campo (CE-UNS) del experimento 2: Respuesta de poblaciones ruderales argentinas de *H. annuus* ante el déficit hídrico durante R1-R9. Se observa el suelo de las macroparcelas cubierto con nylon. En el medio de las macroparcelas se divisan las parcelas de girasol en estado vegetativo, dispuestas en hilera, y en los bordes sorgo.



**Imagen 4:** Plantas de 8TF en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.





**Imagen 6:** Plantas de SuCMoV-C.1 en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.



**Imagen 7:** Plantas de SuCMoV-C.2 en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.



**Imagen 8:** Plantas de SuCMoV-C.3 en estado reproductivo, derecha, cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.



**Imagen 9:** Plantas de SuCMoV-C.4 en estado reproductivo cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.



**Imagen 10:** Capítulo de una planta de SuCMoV-C.4 con flores liguladas con forma tubular.



**Imagen 11:** Plantas de la población con fecundación selectiva *in vivo* RIV-FS en estado reproductivo, cultivadas en un jardín común en el CE-UNS en 2014-15. Se observan capítulos tapados con bolsas de poliamida para la producción de semillas.

