

Correlation between the responses of leaf expansion and hypocotyl elongation to water deficit in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes

Natalia E Sato ¹, Gustavo Pereyra Irujo ^{1,2}, Cecilia M Creus ¹ and Luis A N Aguirrezabal ^{1,2}

¹ Unidad Integrada Balcarce (Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria),), ruta 226, km 73,5, Balcarce, CC 276 (7620), Argentina, ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rivadavia 1917, Ciudad de Buenos Aires, CP C1033AAJ, Argentina. E-mail: laguirre@mdp.edu.ar

- Water stress is a major constraint to crop yields worldwide, and leaf growth is a key trait determining crop tolerance. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes have been detected with contrasting response to water stress. The measurement of this response is, however, very time- and resource-consuming. The measurement of hypocotyl elongation rate is a simple method that could allow the evaluation of the response to water deficit without the need to grow adult plants. There is not any evidence, however, of a correlation between the responses at hypocotyl and leaf level. Therefore, the objective was to evaluate the relationship between the response to water deficit of leaf growth (measured in a previous work) and hypocotyl elongation in a group of nine genotypes of sunflower with contrasting leaf expansion response.
- Twenty five seeds of each genotype were sown in sealed plastic boxes filled with 1 kg of washed river sand and watered with 90 mL of distilled water (control) or 90 mL of 12% polyethylene glycol 6000 (PEG) (water deficit). Plants were grown in the dark at 25°C, in a controlled growth chamber, arranged in a complete randomized block design with 3 replicates in time. Hypocotyl length measurements were done using a millimeter ruler 3 days after sowing. The response of hypocotyl growth to water deficit was calculated as the ratio between hypocotyl length under water deficit and under control conditions, for each genotype. The response of leaf growth to water deficit was calculated (from previous data) as the ratio between final area of leaf 8 under water deficit and control conditions. Regression and correlation analyses were performed with both responses.
- The response of hypocotyl growth to water deficit ranged between 31 and 58%, while that of leaf growth ranged between 50 and 63%. There was a significant positive correlation ($p < 0,01$ $R^2 = 0,61$) between both responses. Correlation was also significant using Pearson Correlation Test ($p < 0,05$ $r = 0,78$).
- We conclude that the results obtained in this investigation, using a range of genotypes that represent a significant proportion of the genetic variability of cultivated sunflower, set the grounds for the development of a simple and rapid method to evaluate the tolerance to water deficit. These results suggest that the growth response of leaves and hypocotyls to water deficit is affected similarly by water deficit. More studies would be interesting in order to identify common physiological and genetic mechanisms involved in leaf growth and hypocotyl elongation and their responses to water deficit in sunflower.
- The development of a fast and early method for the evaluation of the response of sunflower genotypes to water deficit could enable a wide application of this trait as a selection criterion in breeding programs. This would contribute to the development of new varieties with improved tolerance to water deficit.

Key Words: hypocotyl elongation - leaf expansion - sunflower (*Helianthus annuus* L.) - water deficit.

INTRODUCCIÓN

El déficit hídrico es la principal limitante del rendimiento de los cultivos a nivel mundial y en Argentina, reduce frecuentemente el de girasol (Mercau et al, 2001), dado que esta especie es cultivada mayoritariamente en secano. Por esta razón, el cultivo de variedades capaces de utilizar el agua disponible con alta eficiencia es de suma importancia (Condon et al, 2004). La disminución del crecimiento foliar es una de las respuestas tempranas de las plantas al déficit hídrico. Esta respuesta “anticipada” permite reducir la tasa de transpiración y facilita la conservación del agua (Connor y Jones, 1985). Pero esto sucede a expensas de una reducción del potencial de rendimiento, dado que la fotosíntesis se encuentra ligada al área foliar total de la planta. La reducción de la tasa de expansión foliar bajo déficit hídrico puede deberse a diversos mecanismos, tales como el decrecimiento de la tasa de división celular (Granier et al, 2000), el endurecimiento de la pared celular (Neumann, 1995) o la disminución de la turgencia (Bouchabké et al, 2006).

La aplicación conjunta de modelos ecofisiológicos robustos de análisis del crecimiento foliar de *Arabidopsis thaliana* (Granier et al, 2002) y de girasol (Dosio et al, 2003) junto con la aplicación de métodos que permiten caracterizar de manera rigurosa e inequívoca la tolerancia de diferentes genotipos al déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana* (Granier et al, 2006) y en girasol (Pereyra Irujo et al, 2007) permitió detectar variabilidad genética tanto para la respuesta de la tasa como de la duración de la expansión foliar en ambas especies (Aguirrezabal et al, 2006; Pereyra Irujo et al, 2008). En las dos especies mencionadas se detectaron genotipos que frente a un mismo nivel de déficit hídrico disminuyeron en diferente grado su tasa de crecimiento y/o aumentaron la duración de la etapa en que la hoja se expande. Estos trabajos permitieron la identificación de genotipos contrastantes para la respuesta de ambas variables subyacentes a la dinámica de expansión de la hoja bajo déficit hídrico (Pereyra Irujo et al, 2008). Entre las líneas identificadas, se destacaron HA64 y HAR2 que presentaron respuesta contrastante al déficit hídrico. HA64 redujo poco su tasa de expansión foliar e incrementó escasamente la duración de este proceso. Por otra parte, HAR2 presentó el comportamiento opuesto.

La identificación de características útiles para la evaluación fenotípica de la tolerancia a la sequía es un desafío mayor para el mejoramiento. En este sentido, la utilización de atributos que puedan ser identificados en estadios tempranos del desarrollo de las plantas permite subsanar la lentitud y complejidad de la evaluación fenotípica de los mismos (Chimenti et al, 2006). La medición de la expansión foliar y la caracterización de las dos variables que la explican resulta de difícil aplicabilidad como criterio de selección en programas de mejoramiento, por la alta demanda operativa y de espacio de los ensayos y fundamentalmente por la necesidad de cultivar plantas adultas. Por esta razón, es importante desarrollar métodos que permitan identificar fuentes de tolerancia a sequía en forma rápida y sencilla, en estadios juveniles de las plantas. El estudio del crecimiento de los hipocótilos de girasol y su respuesta al déficit hídrico permitiría desarrollar un método simple y precoz de evaluación genotípica de la tolerancia al déficit hídrico, si existiera correlación entre la respuesta de expansión foliar y la de crecimiento de hipocótilos al déficit hídrico.

Por lo tanto se planteó como objetivo de este trabajo, evaluar la posible relación entre la respuesta al déficit hídrico de la expansión foliar y la de elongación del hipocótilo en una colección de 9 genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L) con respuesta contrastante al déficit hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procedió al análisis de una colección de 9 genotipos (HA124, HA64, HA89, HAR1, HAR2, HAR3, HAR4, HAR5 y ND761) que incluyen un gran parte de la variabilidad genética de la especie cultivada, ya evaluada por Pereyra Irujo et al. (2008). Un total de 25 semillas (sin previa hidratación) de cada genotipo se sembraron en contenedores plásticos con tapa hermética (24 cm largo x 10,5 cm ancho x 17,5 cm alto), conteniendo 1 kg de arena de río (lavada y tamizada) mezclada homogéneamente con 90 mL de agua destilada (control) ó 90 mL de polietilenglicol 6000 (PEG) al 12% (déficit hídrico). Cada semilla se introdujo a una profundidad de 2,5 cm de la superficie, a lo largo de 3 hileras a 3 cm de distancia entre si y 1 cm de distancia entre semillas. Se empleó una cámara de crecimiento a temperatura constante de 25°C. Los experimentos se realizaron en condiciones de completa oscuridad. El diseño experimental consistió en bloques completos aleatorizados con tres réplicas en el tiempo. Los muestreos fueron destructivos. Se realizaron mediciones de la longitud de los hipocótilos utilizando una regla milimetrada, a los 3 días desde la fecha de siembra. La respuesta de la elongación de los hipocótilos bajo déficit fue

definida como la proporción entre la longitud (cm) del hipocótilo bajo déficit hídrico y bajo condiciones control. La respuesta del crecimiento foliar bajo déficit hídrico fue calculada para la hoja 8 (a partir de datos previos) como la proporción entre el área final (mm²) bajo déficit hídrico y bajo condiciones control. Se realizó ANOVA utilizando el paquete estadístico R, y análisis de correlación (Pearson), regresión lineal, entre otros estadísticos (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

Se determinó la longitud de los hipocótilos de cada uno de los genotipos en condiciones control y bajo déficit (Tabla 1). Las longitudes variaron entre 0,47 (HA64) y 1,48 (HAR2) en condiciones control y entre 0,26 (HAR5) y 0,59 (HAR2) bajo déficit hídrico. Las respuestas de la elongación (%) de los hipocótilos al día 3 desde la fecha de siembra se muestran en la Fig. 1. La mayor respuesta de elongación de hipocótilos bajo déficit correspondió al genotipo HA64. Por el contrario la de menor respuesta correspondió a HAR5. En HA64 y HAR2 la respuesta del área final de la hoja 8 varió entre 40 y 50 % siendo mayor el porcentaje para HA64 (Pereyra Irujo et al, 2008). En el presente trabajo, se observó que la respuesta en la elongación de hipocótilos para HA64 y HAR2 varió entre 40 y 58 %, siendo también mayor la respuesta para HA64, por lo que ambos genotipos de respuesta foliar contrastante muestran también respuesta contrastante en el crecimiento del hipocotilo. Los genotipos HA124, HA89, HAR1, HAR4 y ND760 respondieron de manera similar tanto en la evaluación del crecimiento del hipocótilo como en la de la hoja 8. Por otra parte, HAR3 y HAR5 que responden similarmente al déficit en la expansión de la hoja 8, la respuesta de crecimiento del hipocótilo en el genotipo HAR5 fue menor en comparación con el resto. La respuesta de la elongación de los hipocótilos bajo déficit hídrico varió entre 31 y 58%, mientras que la respuesta del crecimiento foliar fluctuó entre 50 y 63%. Se encontró una correlación significativa ($P < 0,01$, $R^2 = 0,61$) entre ambas respuestas (Fig.2). Asimismo, resultó significativa mediante análisis de Pearson ($P < 0,05$; $r = 0,78$).

Tabla 1. Longitud (cm) de hipocótilos a los 3 días desde la fecha de siembra en condiciones control (C) y bajo déficit hídrico (DH). Los valores corresponden a la media \pm desvío estándar de tres réplicas independientes cada una de 25 semillas iniciales para 9 genotipos de girasol.

Genotipos	Longitud (cm) DH	Longitud (cm) C
HA124	0,46 \pm 0,12	1,03 \pm 0,15
HA64	0,27 \pm 0,12	0,47 \pm 0,17
HA89	0,48 \pm 0,10	1,16 \pm 0,26
HAR1	0,33 \pm 0,07	0,68 \pm 0,11
HAR2	0,59 \pm 0,03	1,48 \pm 0,11
HAR3	0,38 \pm 0,07	0,92 \pm 0,23
HAR4	0,31 \pm 0,09	0,71 \pm 0,08
HAR5	0,26 \pm 0,12	0,84 \pm 0,46
ND761	0,41 \pm 0,06	0,85 \pm 0,04

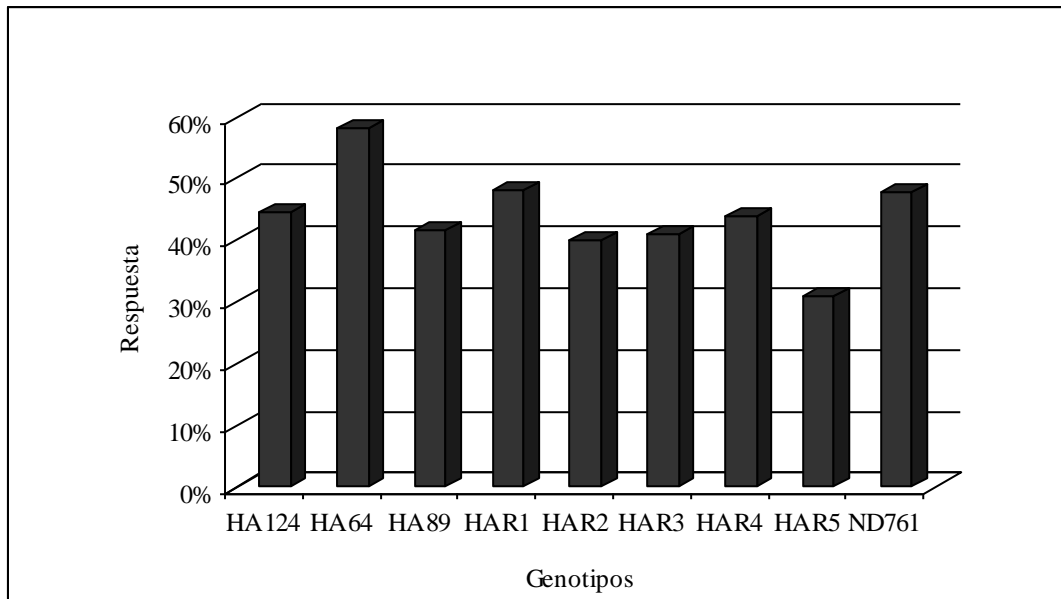


Fig. 1. Respuesta (%) de la elongación de los hipocótilos al día 3 desde la fecha de siembra al déficit hídrico. Cada barra corresponde a la media de 3 réplicas independientes cada una iniciada con 25 semillas en 9 genotipos de girasol

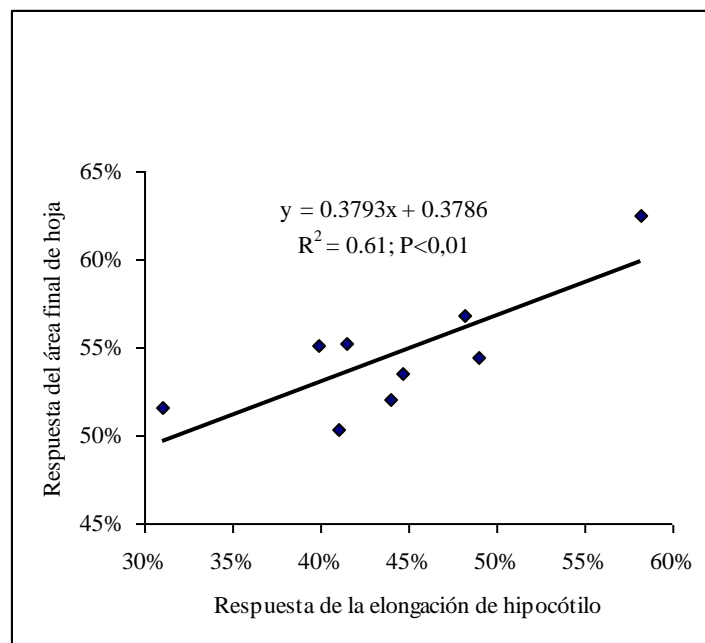


Fig. 2. Relación entre la respuesta del área final de la hoja número 8 (datos de Pereyra Irujo et al, 2008) y la respuesta de la elongación de hipocótilos al día 3 desde la fecha de siembra al déficit hídrico.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación en la que se han analizado un amplio rango de genotipos que representan una gran proporción de la variabilidad genética de la especie cultivada, constituyen una evidencia de la relación existente entre la respuesta de la expansión foliar y la de elongación de hipocótilos al déficit hídrico en girasol.

Aunque la correlación obtenida no es muy alta, es estadísticamente significativa ($P < 0,01$), lo que indicaría que las respuestas en ambos órganos, cuyas funciones biológicas son muy diferentes, se verían afectadas de una manera similar bajo déficit hídrico, lo cual podría indicar mecanismos fisiológicos similares. Es conocido que el crecimiento foliar depende de la plasticidad y elasticidad de las paredes celulares y de las características mecánicas influidas por la composición de los polímeros componentes y por la actividad de numerosas enzimas, tales como las peroxidasas (Lechner et al, 2010). Algunos estudios indican que el crecimiento de los hipocótilos también estaría regulado en parte por estas mismas peroxidasas (Sánchez et al, 1996; Pedreira et al. 2004). Dichos autores encontraron que existe una alta correlación entre los niveles de peróxido de hidrógeno apoplástico y la tasa de crecimiento de los hipocótilos en *Pinus pinaster* como también entre la relación ascorbato/peróxido de hidrógeno y la tasa de crecimiento de hipocótilos, sugiriendo que estos mecanismos controlarían en parte el crecimiento tanto de hipocótilos como de hojas. Estos datos son congruentes con el contenido de ascorbato extracelular que inhibe a las peroxidasas apoplásticas durante el desarrollo foliar (Pinedo et al, 2010).

El efecto del déficit hídrico sobre el crecimiento foliar consiste no sólo en la reducción de la tasa de expansión sino también en la duración del mismo (Pereyra Irujo et al, 2008). Ellos indicaron que las diferencias entre genotipos en la reducción del área final foliar fueron causadas por diferencias en la reducción de la tasa de expansión o por diferencias en el crecimiento compensatorio ocurrido durante el incremento en la duración de la expansión. Los cambios en tasa y duración contribuyeron en una medida similar a la variabilidad en la disminución del área final de la hoja. Cabe destacar que los genotipos HA64 y HAR2 fueron los contrastantes para estas características. HA64 redujo levemente la tasa de expansión foliar e incrementó escasamente la duración de este proceso, mientras que HAR2 presentó el comportamiento opuesto. Los resultados en la presente investigación muestran que para todos los genotipos analizados las respuestas al déficit en el hipocotilo y en la hoja 8 fueron similares.

Los resultados de este trabajo demuestran que el estudio de los hipocótilos de girasol constituye un método simple y precoz de evaluación genotípica de la tolerancia al déficit hídrico. Por todo lo anteriormente mencionado, sería interesante que se realizaran más estudios en el futuro con la finalidad de comprender e identificar los mecanismos fisiológicos y genéticos involucrados en las respuestas del crecimiento bajo déficit hídrico tanto en hojas como en hipocótilos de girasol.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto PAE 37100 - PID 2007-00066 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Argentina.

REFERENCIAS

- Aguirrezábal, L. Bouchier-Combaud, S. (ex aequo), Radziejowski, A. Dauzat, M. Cookson, S.J. y Granier, C. 2006. Plasticity to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* dissections of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant Cell and Environment*. 29: 2216-2227.
- Bouchabké, O. Tardieu, F. y T. Simonneau. 2006. Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays* L.) respond to evaporative demand under moderate irrigation but not in water saturated soil. *Plant, Cell and Environment*. 29, 1138-1148.
- Burlyn, E. M. y M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*. 51: 914-916.
- Condon, A.G. Richards, R.A. Rebetzke, G.J. y G.D. Farquhar. 2004. Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany*. 55:2447-2460.

- Connor, D.J. y T.R. Jones. 1985. Response of sunflower to strategies of irrigation. Morphological and physiological responses to water stress. *Field Crops Research*. 12: 91-103.
- Chimenti, C. Marcantonio, M. y A. Hall. 2006. Divergent selection for osmotic adjustment result in improved drought tolerance in maize (*Zea Mays* L.) in both early growth and flowering phases. *Field Crop Research*. 95: 305-315.
- Dosio, G.A.A. Rey, H. Lecoeur, J. Izquierdo, N.G. Aguirrezábal, L.A.N. Tardieu, F. Turc, O. 2003. A whole-plant analysis of the dynamics of expansion of individual leaves of two sunflower hybrids. *Journal of Experimental Botany*. 54, 2541–2552.
- Granier, C. Turc, O. y F. Tardieu. 2000. Co-ordination of cell division and tissue expansion in sunflower, tobacco, and pea leaves: dependence or independence of both processes? *Journal of Plant Growth Regulation*. 19(1):45-54.
- Granier, C. Massonnet, C. Turc, O. Muller, B. Chenu, K. y Tardieu F. 2002. Individual leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a stable thermal-time based programme. *Annals of Botany*. 89, 595-604.
- Granier, C. Aguirrezábal, L. Chenu, K. Cookson, S.J. Dauzat, M. Hamard, P. Thioux, J.J. Rolland, G. Bouchier-Combaud, S. Lebaudy, A. Muller, B. Simonneau, T. y F. Tardieu. 2006. PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytologist*. 169: 623-625.
- Lechner, L. Pinedo, M. Creus, C. y L. Aguirrezabal. 2010. Actividad de peroxidasas solubles del apoplasto y unidas a pared de hojas de girasol en situaciones de déficit hídrico. Resúmenes de presentaciones Taller ASAGIR 2010. Mar del Plata, 30 y 31 de marzo de 2010. 16.
- Mercau, J.L. Sadras, V.O. Satorre, E.H. Messina, C. Balbi, C. Uribelarrea, M. y Hall, A.J. 2001. On-farm assessment of regional and seasonal variation in sunflower yield in Argentina. *Agricultural Systems*. 67:83-103.
- Neumann PM. 1995. The role of cell wall adjustments in plant resistance to water deficits. *Crop Science*. 35, 1258–1266.
- Pedreira, J. Sanz, N. Peña, M.J. Sánchez, J. Queijeiro, E. Revilla, G. y I. Zarra. 2004. Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in Pine hypocotyls. *Plant and Cell Physiology*. 45(5): 530-534
- Pereyra-Irujo, G.A. Velázquez, L. Granier, C. y L.A.N. Aguirrezábal. 2007. A method for drought tolerance screening in sunflower. *Plant Breeding*. 162(4): 445-448.
- Pereyra-Irujo, G.A. Velázquez, L. Lechner, L. y L.A.N. Aguirrezábal. 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: 2221-2232.
- Pinedo, M. Lechner, L. Creus, C. Simontacci, M. y L. Aguirrezabal. 2010. El ascorbato extracelular inhibe las peroxidasas apoplásticas durante el desarrollo foliar. Resúmenes de presentaciones Taller ASAGIR 2010. Mar del Plata, 30 y 31 de marzo de 2010. 17.
- Sánchez, M. Peña, M.J. Revilla, G. y Zarra, I. 1996. Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. *Plant Physiology*. 111:941-946.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1981. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Editorial H. Blumé. Madrid, España, 830.