

**Dormición en aquenios de girasol (*Helianthus annuus* L.):  
Bases fisiológicas y derivación de tecnologías para su eliminación a  
escala industrial**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Ciencias Agropecuarias*

**Constanza Pía Dominguez**

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires - 2010

Lugar de trabajo: Cátedra de Cultivos Industriales e IFEVA -  
Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires





## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Roberto Luis Benech-Arnold**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Doctor of Philosophy (University of Southampton, United Kingdom)

Co-director

**Diego Batlla**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Consejera de Estudios

**Liliana Windauer**

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

## JURADO DE TESIS

Director de tesis

**Roberto Luis Benech-Arnold**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Doctor of Philosophy (University of Southampton, United Kingdom)

JURADO

**Karina F. Ribichich**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires, Argentina)  
Doctora en Ciencias (Universidade de São Paulo, Brasil)

JURADO

**María Virginia Luna**

Bióloga (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina)  
Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina)

JURADO

**Miguel Cantamutto**

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Sur, Argentina)  
Magister en Producción Vegetal (Universidad Nacional del Sur, Argentina)  
Doctor (Universidad de Lleida, España)

Fecha de defensa de la tesis: 25 de febrero de 2019



*Dedicatoria*

A los curiosos, ávidos de conocimiento.



## *Agradecimientos*

A mi director de tesis, Roberto Benech-Arnold, por haberme dado la posibilidad de desarrollar el doctorado en su grupo de trabajo y por haberme impulsado siempre a ejercitar una mirada crítica frente a las problemáticas y resultados. Aprendí de él en cada instancia del doctorado.

A mi co-director, Diego Batlla, por estar predispuesto en todo momento a discutir los ensayos y resultados y por compartirme sus enfoques.

A mi consejera de estudios, Liliana Windauer, por su gran apoyo e inquebrantable optimismo, muy necesario en algunas etapas.

A María Verónica Rodríguez, que si bien no formó parte de mi comité consejero, trabajó codo a codo conmigo y de quien destaco la frescura con la que se plantea nuevos interrogantes y posibles soluciones.

A Dow AgroSciences, por haber acercado la problemática que dio origen a esta tesis, por financiarla y por abrirme las puertas de su empresa, tanto para realizar los ensayos en su planta como para discutir resultados. A Magdalena Gerbaldo y Marcelo Altobello por la gran predisposición que pusieron en este proyecto.

A la UBA por haber contribuido a la financiación de esta tesis.

Al CONICET por haberme otorgado la beca doctoral.

A la EPG por estos años de formación.

A los jurados de esta tesis por sus valiosos aportes.

A la FAUBA por todos los recursos que me brindó. Gracias a la Cátedra de Cultivos Industriales, que hoy es mi segundo hogar. A mis compañeros becarios, en especial a Rocío, Quique, Honduras, Kelly, Marianne, Magui, Rena y Fer, con quienes compartí de todo y se convirtieron en mis amigos. A los profesores de la cátedra, por el acompañamiento de estos años y por ayudarme a crecer. A Mirta por su labor con los trámites y a Luis por su colaboración con el campito. A las Cátedras de Cereales y Producción Vegetal por el inagotable compañerismo.

A Silvina Enciso por todas las determinaciones de ABA.

A Patricia del Fueyo por compartir sus conocimientos conmigo.

A Anita Mantese por su gran predisposición, sobre todo con las entregas a contra reloj.

A Liliana, mi mamá, por la conducción y contención que sólo las madres saben brindar. Sin ella, se me hubiera hecho mucho más pesado. Gracias por forjar mi confianza y por educarme con infinito amor.

A Héctor, mi papá, por la gran cantidad de veces que accedió a mis pedidos para que terminemos temprano el almuerzo de los domingos para venirme a medir germinación a la facu.

A Daniela, mi hermana, quien fue mi diseñadora y editora personal de todas las figuras de esta tesis y sus respectivos papers, además de los posters a lo largo del doctorado. Por su incansable buena voluntad para realizar la innumerable cantidad de cambios que le pedí hasta llegar a la versión final. Por mostrarme siempre el medio vaso lleno.

A Marita, por sus inestimables consejos.

A Susi y Santiago por el continuo aliento.

A todos los que contribuyeron a este logro.



*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

Constanza Pía Domínguez



**Publicaciones derivadas de la tesis**

1) Dominguez, C.P., D. Batlla, M.V. Rodríguez, L.B. Windauer, M. Gerbaldo, y R.L. Benech-Arnold. 2016. Pericarp-imposed dormancy in sunflower: Physiological basis, impact on crop emergence, and removal at an industrial scale. *Crop Sci.* 56: 716–726. doi: 10.2135/cropsci2015.06.0335.

2) Dominguez, C.P., M.V. Rodríguez, D. Batlla, I.E. García de Salamone, A.I. Mantese, A.L. Andreani, y R.L. Benech-Arnold. 2019. Sensitivity to hypoxia and microbial activity are instrumental in pericarp-imposed dormancy expression in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Seed Sci. Res.* 29: 85–96. doi: 10.1017/s0960258519000060.



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvii
ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMEN.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
CAPÍTULO 1.....	1
Introducción general: Revisión de antecedentes y presentación del problema.....	1
1.1. Introducción.....	3
1.1.1. Dormición: Definición y su impacto sobre los cultivos.....	3
1.1.2. Clasificaciones de la dormición.....	3
1.1.3. Regulación hormonal de la dormición.....	5
1.1.4. Relación entre dormición y disponibilidad de oxígeno al embrión.....	6
1.1.5. La especie objeto de estudio: <i>Helianthus annuus</i> L. (girasol).....	6
1.1.5.1. Origen, distribución e importancia económica.....	6
1.1.5.2. Descripción del fruto.....	7
1.1.5.3. El proceso de domesticación sobre la dormición.....	7
1.1.5.4. Dormición en esta especie.....	9
1.2. Objetivos.....	10
1.2.1. Objetivo general.....	10
1.2.2. Objetivos específicos.....	10
1.3. Hipótesis de trabajo.....	10
1.4. Estructura de la tesis.....	11
CAPÍTULO 2.....	13
El papel del pericarpio en la expresión de la dormición en aquenios de girasol.....	13
Resumen.....	15
2.1. Introducción.....	17
2.2. Materiales y métodos.....	19
2.2.1. Material vegetal y terminología utilizada.....	19
2.2.2. Germinación de aquenios pertenecientes a distintos ambientes, a distintas temperaturas de incubación.....	20
2.2.3. Estructura del pericarpio por microscopía óptica.....	20
2.2.4. Efecto de la temperatura de incubación y de los diferentes tejidos que recubren al embrión sobre la expresión e imposición de la dormición, respectivamente.....	21
2.2.5. Contenido embrionario de ABA en semillas y aquenios a diferentes temperaturas de incubación.....	22
2.2.6. Sensibilidad embrionaria al ABA durante la incubación de semillas a diferentes temperaturas.....	22
2.2.7. Efecto del etileno y las giberelinas sobre la germinación de aquenios.....	22
2.2.8. Efecto del fluridone sobre la germinación de aquenios.....	23
2.2.9. Análisis estadístico.....	23
2.3. Resultados.....	23
2.3.1. Germinación de aquenios pertenecientes a distintos ambientes, a distintas temperaturas de incubación.....	23
2.3.2. Estructura del pericarpio por microscopía óptica.....	25

2.3.3. Efecto de la temperatura de incubación y de los diferentes tejidos que recubren al embrión sobre la expresión e imposición de la dormición, respectivamente .....	27
2.3.4. Contenido embrionario de ABA en semillas y aquenios a diferentes temperaturas de incubación .....	29
2.3.5. Sensibilidad embrionaria al ABA durante la incubación de semillas a diferentes temperaturas .....	30
2.3.6. Efecto del etileno y las giberelinas sobre la germinación de aquenios .....	30
2.3.7. Efecto del fluridone sobre la germinación de aquenios .....	31
2.4. Discusión .....	31
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>35</b>
Efecto del hipoclorito de sodio aplicado a escala industrial para eliminar la dormición impuesta por el pericarpio .....	35
Resumen .....	37
3.1. Introducción .....	39
3.2. Materiales y métodos .....	40
3.2.1. Material vegetal y terminología utilizada .....	40
3.2.2. Tratamiento de hipoclorito de sodio sobre aquenios, aplicado en condiciones de laboratorio .....	40
3.2.3. Contenido embrionario de ABA en aquenios no tratados y tratados con hipoclorito de sodio, aplicado en condiciones de laboratorio .....	40
3.2.4. Tratamiento de hipoclorito de sodio sobre aquenios, aplicado a escala industrial .....	41
3.2.4.1. Germinación en laboratorio .....	42
3.2.4.2. Emergencia a campo .....	42
3.2.4.3. Germinación en laboratorio, simulando condiciones de campo .....	43
3.2.5. Análisis estadístico .....	43
3.3. Resultados .....	43
3.3.1. Tratamiento de hipoclorito de sodio sobre aquenios, aplicado en condiciones de laboratorio .....	43
3.3.2. Contenido embrionario de ABA en aquenios no tratados y tratados con hipoclorito de sodio, aplicado en condiciones de laboratorio .....	44
3.3.3. Tratamiento de hipoclorito de sodio sobre aquenios, aplicado a escala industrial .....	44
3.3.3.1. Germinación en laboratorio .....	44
3.3.3.2. Emergencia a campo .....	45
3.3.3.3. Germinación en laboratorio, simulando condiciones de campo .....	47
3.4. Discusión .....	48
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>51</b>
La expresión de la dormición a altas temperaturas: Su relación con el aumento de la sensibilidad a la hipoxia y la actividad microbiana .....	51
Resumen .....	53
4.1. Introducción .....	55
4.2. Materiales y métodos .....	56
4.2.1. Material vegetal y terminología utilizada .....	56
4.2.2. Germinación de aquenios y semillas a diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas de incubación .....	56
4.2.3. Estructura del pericarpio por microscopía óptica .....	58

4.2.4. Contenido de ABA de semillas durante la incubación bajo diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas .....	59
4.2.5. Sensibilidad al ABA en semillas incubadas bajo diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas .....	59
4.2.6. Medición del consumo de oxígeno durante la incubación de pericarpios aislados a diferentes temperaturas, en presencia y ausencia de antibióticos .....	59
4.2.7. Efecto del uso de antibióticos sobre la germinación del aquenio y sus comunidades microbianas a alta temperatura de incubación.....	60
4.2.8. Análisis estadístico .....	61
4.3. Resultados .....	61
4.3.1. Germinación de aquenios y semillas a diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas de incubación .....	61
4.3.2. Estructura del pericarpio por microscopía óptica.....	63
4.3.3. Contenido de ABA de semillas durante la incubación bajo diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas .....	64
4.3.4. Sensibilidad al ABA en semillas incubadas bajo diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas .....	66
4.3.5. Medición del consumo de oxígeno a diferentes temperaturas de incubación, en presencia y ausencia de antibióticos .....	66
4.3.6. Efecto del uso de antibióticos sobre la germinación del aquenio y sus comunidades microbianas a alta temperatura de incubación.....	67
4.4. Discusión.....	70
CAPÍTULO 5 .....	75
Discusión general .....	75
Resumen.....	77
5.1. Marco conceptual de la problemática abordada.....	79
5.2. Contrastación de las hipótesis planteadas en el Capítulo 1.....	80
5.3. Modelo de respuesta a la dormición .....	81
5.4. Aplicaciones futuras.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	85



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2. 1. Número de capas de células del esclerénquima y espesor del esclerénquima ( $\mu\text{m}$ ) de aquenios pertenecientes al sitio Luján de Cuyo de la campaña de producción 2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012. Los valores son las medias $\pm$ el error estándar de la media para seis aquenios por campaña de producción, con tres mediciones por aquenio. .....	26
Cuadro 2. 2. Germinación (%) de aquenios (i.e., A), aquenios con un corte lateral que afectó la mitad del largo del pericarpio hacia el eje embrionario (i.e., Pd), aquenios con un corte lateral que afectó la mitad del largo del pericarpio hacia el eje embrionario sumado a un daño en la cubierta seminal y el endosperma (i.e., Pd+CSd+Ed) y aquenios después de la eliminación del pericarpio pero sin dañar la cubierta seminal ni el endosperma (i.e., S), pertenecientes a la línea endocriada, después de 20 d de incubación a 25°C y 30°C en agua destilada. Los valores son las medias $\pm$ el error estándar de la media para cuatro réplicas.....	29
Cuadro 2. 3. Germinación (%) de semillas de la línea endocriada después de 20 d de incubación a 12°C, 25°C y 30°C en agua destilada (i.e., control) y soluciones de ácido abscísico (ABA) a concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA. Los valores son las medias $\pm$ el error estándar de la media para tres réplicas.....	30
Cuadro 2. 4. Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada después de 20 d de incubación a 25°C y 30°C en agua destilada (i.e., control), soluciones de Tifón a concentraciones de 10, 100, y 500 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Tifón, y soluciones de giberelinas ( $\text{GA}_3$ ) a concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ $\text{GA}_3$ . Los valores son las medias $\pm$ el error estándar de la media para cinco réplicas. ....	31
Cuadro 2. 5. Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada después de 20 d de incubación a 30°C en agua destilada (i.e., control) y soluciones de fluridone a concentraciones de 5, 10, 50, 100 y 500 $\mu\text{mol l}^{-1}$ fluridone. Los valores son las medias $\pm$ el error estándar de la media para tres réplicas. ....	31
Cuadro 3. 1. Tratamientos aplicados a escala industrial sobre aquenios de la línea endocriada. Tratamientos 1-11 fueron aplicados a aquenios dormidos; el tratamiento 12 fue aplicado al control no dormido. El 1° químico fue un insecticida líquido (Reldan Plus, $2 \times 10^{-5}$ l kg de aquenios <sup>-1</sup> , Dow AgroSciences, Argentina) que Dow AgroSciences aplica a los aquenios previo al almacenaje en el silo. El 2° químico fue una mezcla líquida que Dow AgroSciences aplica a los aquenios previo a la siembra que contiene agua ( $2 \times 10^{-3}$ l kg de aquenios <sup>-1</sup> ), un fungicida (Apron Gold, $3 \times 10^{-3}$ l kg de aquenios <sup>-1</sup> , Syngenta Production France S.A.S., Francia), un polímero (Secure, $7 \times 10^{-4}$ l kg de aquenios <sup>-1</sup> ), un colorante (Blue Solid, $3 \times 10^{-3}$ l kg de aquenios <sup>-1</sup> ), y un insecticida (Cruiser 60 FS semillero, $6 \times 10^{-3}$ l kg de aquenios <sup>-1</sup> , Syngenta Crop Protection Inc., Estados Unidos).....	42
Cuadro 3. 2. Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada correspondientes a los tratamientos 1-12 después de 20 d de incubación a 12°C, 25°C y 30°C en agua destilada. Los tratamientos están descriptos en el Cuadro 3. 1. Los valores son las medias $\pm$ el error estándar de la media para tres réplicas. ....	45

Cuadro 3. 3. Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada pertenecientes a los tratamientos 1-12 después de 20 d de incubación en agua destilada para cuatro condiciones de incubación: aquenios no lavados y aquenios lavados con agua destilada durante 15 min previo a la incubación en agua destilada a 25°C (constante) y a temperaturas alternadas (15°C durante 12 h y 35°C durante 12 h). Los tratamientos están descritos en el Cuadro 3. 1. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para tres réplicas. Los resultados del ANOVA también son mostrados. .... 48

Cuadro 4. 1. Número de capas de células del esclerénquima y espesor del esclerénquima ( $\mu\text{m}$ ) de aquenios de la línea endocriada y del híbrido comercial. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para seis aquenios por genotipo, con tres mediciones por aquenio. .... 64

Cuadro 4. 2. Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada y del híbrido comercial después de 10 d de incubación a 30°C en agua destilada (i.e., control) y antibióticos. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para cuatro réplicas. .... 68

Cuadro 4. 3. Colonias bacterianas/ $\text{cm}^2$  presentes en la dilución  $1 \times 10^{-4}$ , perteneciente al tratamiento control y tratamiento con antibióticos, para la línea endocriada y el híbrido comercial después de 24 h de incubación a 30°C. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para tres réplicas. .... 68

Cuadro 4. 4. Diversidad funcional de comunidades bacterianas y fúngicas analizadas usando el Índice H, el cual fue obtenido de los valores de absorbancia de los perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP por sus siglas en inglés) de las microplacas, para ambos genotipos (línea endocriada e híbrido comercial) y tratamientos (con y sin antibióticos). Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para cuatro réplicas. .... 70

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. 1. Sección longitudinal de un aquenio de girasol, que muestra el pericarpio y la semilla, 4<sup>x</sup> (A). Sección transversal de un cotiledón de una semilla; la epidermis interna será la superficie superior del cotiledón cuando la semilla germine, 28<sup>x</sup> (B). Redibuja por Seiler (1997) de Pustovoit (1975). ..... 7
- Figura 2. 1. Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada pertenecientes a distintos ambientes, definidos por distintas combinaciones de campañas (2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012), sitios de producción (Colón, Hilario Ascasubi y Luján de Cuyo) y fechas de siembra (FS) (una fecha de siembra aunque en ocasiones hubo dos o tres), incubados en agua destilada a 12°C (A), 25°C (B) y 30°C (C). Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 25
- Figura 2. 2. Secciones transversales de la parte central de aquenios de la línea endocriada pertenecientes al sitio Luján de Cuyo de la campaña de producción 2009/2010 (A), 2010/2011 (B) y 2011/2012 (C). Abreviaturas: ep, epidermis; h, hipodermis; es, esclerénquima; pa, parénquima; cs, cubierta seminal; en, endosperma; em, embrión. Barra de escala = 50 µm. .... 26
- Figura 2. 3. Germinación (%) de aquenios, semillas y embriones de la línea endocriada incubados en agua destilada a 12°C (A), 25°C (B) y 30°C (C). Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 27
- Figura 2. 4. Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada incubados en agua destilada después de 15 d a 30°C, 5 d a 30°C y luego 10 d a 12°C, 3 d a 30°C y luego 12 d a 12°C y 15 d a 12°C. Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el espesor de la línea. .... 28
- Figura 2. 5. Contenido embrionario de ABA durante la incubación en agua destilada. Aquenios y semillas incubados a 30°C (A) y aquenios incubados a 12°C y 30°C (B). Las barras representan el error estándar de la media para tres réplicas, cada una medida *in duplo*. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las figuras internas muestran la germinación (%) en agua destilada; sus barras representan el error estándar de la media para tres réplicas; y sus barras horizontales indican el período de muestreo para el contenido embrionario de ABA. .... 30
- Figura 3. 1. Germinación (%) de aquenios no tratados y tratados con hipoclorito de sodio (0,5%, 2 min, aplicado en condiciones de laboratorio) incubados en agua destilada a 12°C (A), 25°C (B) y 30°C (C). Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 43

Figura 3. 2. Contenido embrionario de ABA durante la incubación en agua destilada de aquenios no tratados y tratados con hipoclorito de sodio (0,5%, 2 min, aplicado en condiciones de laboratorio) incubados a 30°C. Las barras representan el error estándar de la media para tres réplicas, cada una medida *in duplo*. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. La figura interna muestra la germinación (%) en agua destilada; sus barras representan el error estándar de la media para tres réplicas; y sus barras horizontales indican el período de muestreo para el contenido embrionario de ABA. .... 44

Figura 3. 3. Dinámica de la emergencia (%) para el Exp. 1: Tratamientos 1 y 2 y tratamientos 3-11 (A), tratamientos 1 y 2 y tratamientos 8 y 9 (B) y las temperaturas de suelo máximas, promedio y mínimas; el sombreado gris indica las temperaturas mayores a 25°C (C). Los tratamientos están descritos en el Cuadro 3. 1. Las barras representan el error estándar de la media. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 46

Figura 3. 4. Emergencia (%) después de 20 d desde la siembra para el Exp. 2: Tratamientos 1 y 2 y tratamientos 3-11 (A), tratamientos 1 y 2 y tratamientos 8 y 9 (B) y las temperaturas de suelo máximas, promedio y mínimas; el sombreado gris indica las temperaturas mayores a 25°C (C). Los tratamientos están descritos en el Cuadro 3. 1. Las barras representan el error estándar de la media. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el espesor de la línea. Letras diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ). .... 47

Figura 4. 1. Diagrama teórico del sistema para lograr la incubación de semillas y aquenios a concentraciones atmosféricas menores a 21% O<sub>2</sub> dentro de la cámara plástica semi-permeable y a 21% O<sub>2</sub> (i.e., aire) en el contenedor plástico semi-permeable (A). Foto de cámara plástica semi-permeable y del contenedor plástico semi-permeable dentro de la incubadora (B). Foto de las bandejas con semillas y aquenios (C). .... 58

Figura 4. 2. Germinación (%) de aquenios y semillas después de 10 d de incubación a 12°C para la línea endocriada (A) y para el híbrido comercial (C) y después de 7 d de incubación a 30°C para la línea endocriada (B) y para el híbrido comercial (D) en agua destilada a diferentes concentraciones de oxígeno. Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. El sombreado gris indica la diferencia en porcentaje medio de germinación entre la incubación sin pericarpio (i.e., semillas) y con pericarpio (i.e., aquenios) para el rango de concentraciones de oxígeno. .... 63

Figura 4. 3. Fotografías de un aquenio de girasol de la línea endocriada (A) y del híbrido comercial (B) y sus componentes: semilla (embrión y endosperma + cubierta seminal) y pericarpio. .... 64

Figura 4. 4. Secciones transversales de la parte central de aquenios de la línea endocriada (A) y del híbrido comercial (B). Abreviatura: es, esclerénquima. Barra de escala = 50 μm. .... 64

Figura 4. 5. Contenido de ABA evaluado en ejes embrionarios y cotiledones a 5% O<sub>2</sub> y 21% O<sub>2</sub> durante la incubación de semillas de la línea endocriada en agua destilada a 12°C (A) y 30°C (B). Germinación (%) de semillas de la línea endocriada incubadas en agua destilada a 5 y 21% O<sub>2</sub> a 12°C (C) y 30°C (D); las barras horizontales indican el período de muestreo para el contenido de ABA a 5% O<sub>2</sub> (barra llena) y 21% O<sub>2</sub> (barra vacía). Las barras representan el error estándar de la media para tres réplicas, cada una medida *in duplo* (A y B) y para cuatro réplicas (C y D). Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 65

Figura 4. 6. Germinación (%) de semillas de la línea endocriada después de 10 d de incubación a 12°C (A) y 7 d a 30°C (B) en soluciones de ABA a concentraciones de 0 (i.e., agua destilada), 1, 10, y 100 µM ABA a 5 y 21% O<sub>2</sub>. Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 66

Figura 4. 7. Consumo de oxígeno (nmol O<sub>2</sub>/mg PF pericarpio) en el medio de incubación por pericarpios aislados de la línea endocriada a 10 y 30°C (A) y pericarpios aislados del híbrido comercial a 30°C (B) después de 24 h de incubación. Los medios de incubación fueron agua destilada (i.e., control) y antibióticos que consistió en un fungicida comercial (0,75 µl/ml de Ritiram Carb Plus que contiene Thiram 35% y Carbendazim 15%) y tres bactericidas (gentamicina 0,1 mg/ml, ampicilina 0,4 mg/ml, y espectinomicina 0,2 mg/ml), y agua hasta alcanzar el volumen final. Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el espesor de la línea. .... 67

Figura 4. 8. Análisis discriminante de los perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP por sus siglas en inglés) de comunidades bacterianas (A) y fúngicas (B) en aquenios de dos genotipos, tratados y no tratados con antibióticos y evaluados en cuatro réplicas. Los cuadrados corresponden a la línea endocriada y los círculos al híbrido comercial; mientras que los símbolos blancos y negros indican el control y el tratamiento con antibióticos, respectivamente. Los datos usados para el análisis corresponden a los valores de absorbancia a las 96 h. La varianza total explicada por cada eje está mostrada ente paréntesis. .... 69

Figura 5. 1. Modelo de respuesta a la dormición donde se muestran los distintos componentes y su impacto, para la línea (línea endocriada) y el híbrido (híbrido comercial)..... 83



## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados centígrados
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
µmol	Micromoles
%	Porcentaje
A	Aquenos
ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ANOVA	Análisis de varianza
Cl	Cloro
CLPP	Carbon Level Physiological Profiles (sigla en inglés)
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico
d	Día
ERFVII	Factor de respuesta a etileno
ET	Etileno
EtOH	Etanol
Exp.	Experimento
FS	Fecha de siembra
g	Gramos
GA	Giberelinas
GA <sub>3</sub>	Giberelina 3
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
Índice H	Índice de Diversidad de Shannon
kg	Kilos
l	Litros
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
NaClO	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
nmol	Nanomoles
O <sub>2</sub>	Oxígeno
<i>P</i>	Valor p (estadístico)
Pd	Aquenos con un corte lateral que afectó la mitad del largo del pericarpio hacia el eje embrionario
Pd+CSd+Ed	Aquenos con un corte lateral que afectó la mitad del largo del pericarpio hacia el eje embrionario sumado a un daño en la cubierta seminal y el endosperma
PF	Peso fresco
pg	Picogramos
PS	Peso seco

<i>r</i>	Valor de coeficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
S	Aquenos después de la eliminación del pericarpio pero sin dañar la cubierta seminal ni el endosperma
v/p	Volumen/peso
v/v	Volumen/volumen

## RESUMEN

### **DORMICIÓN EN AQUENIOS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.): BASES FISIOLÓGICAS Y DERIVACIÓN DE TECNOLOGÍAS PARA SU ELIMINACIÓN A ESCALA INDUSTRIAL**

El objetivo de esta tesis fue dilucidar los mecanismos fisiológicos involucrados en el control de la dormición en aquenios de girasol (*Helianthus annuus* L.) y derivar tecnologías para su eliminación a escala industrial. Se utilizó una línea endocriada y un híbrido comercial y los resultados permitieron identificar que, en ambos genotipos, la dormición está impuesta por el pericarpio (uno de los tejidos que recubre al embrión) y su expresión ocurre sólo a altas temperaturas de incubación (i.e., 30°C). Sin embargo, no fue posible derivar un único patrón de comportamiento fisiológico para ambos genotipos. Estos patrones se encuentran gobernados por la temperatura a la que se hayan expuestos los aquenios durante la incubación (sólo se expresan a 30°C), pero varían los componentes intervinientes en la respuesta a la dormición en cada genotipo. El pericarpio impuso limitación de oxígeno al embrión (hipoxia) y estos genotipos exhibieron diferencias en su sensibilidad embrionaria a la hipoxia a 30°C. En la línea endocriada, la principal limitación para la germinación del aquenio estuvo impuesta por la alta sensibilidad embrionaria a la hipoxia (mediada por una interferencia en la sensibilidad al ABA), que aumenta a 30°C, la cual, en combinación con el aumento del consumo de oxígeno por la actividad (respiración) microbiana, resultó en expresión de la dormición. En aquenios del híbrido comercial, en cambio, la principal limitación para la germinación provino principalmente de la presencia del pericarpio que representa una severa restricción cuando la actividad microbiana en el pericarpio es aumentada por la alta temperatura de incubación. Esta tesis, además, permitió desarrollar una herramienta tecnológica aplicable a escala industrial, que fue la utilización del hipoclorito de sodio (agente oxidante), y, a su vez, planteó la posibilidad de aplicar un tratamiento de fungicidas y bactericidas durante el curado de las semillas en la industria semillera.

Palabras clave: Dormición, girasol, pericarpio, temperatura, ácido abscísico (ABA), hipoxia, actividad microbiana.



## ABSTRACT

### **DORMANCY IN SUNFLOWER ACHENES (*Helianthus annuus* L.): PHYSIOLOGICAL BASES AND DERIVATION OF TECHNOLOGIES FOR ITS REMOVAL AT AN INDUSTRIAL SCALE**

The aim of this thesis was to elucidate the physiological mechanisms involved in the control of dormancy in sunflower achenes (*Helianthus annuus* L.) and to derive technologies for its elimination at industrial scale. An inbred line and a commercial hybrid were used and the results allowed to identify that, in both genotypes, the dormancy is imposed by the pericarp (one of the embryo-covering tissues) and its expression occurs only at high incubation temperatures (ie, 30°C). However, it was not possible to derive a single physiological pattern of behavior for both genotypes. These patterns are governed by the temperature at which the achenes were exposed during incubation (these are only expressed at 30°C), but the components involved in the dormancy response vary in each genotype. The pericarp imposed oxygen restriction to the embryo (hypoxia) but these genotypes exhibited differences in their embryo sensitivity to hypoxia at 30°C. In the inbred line, the main limitation for achene germination was imposed by the high embryo sensitivity to hypoxia (mediated by an increase in ABA sensitivity), which is enhanced at 30°C, which, in combination with enhanced oxygen consumption by microbial activity (respiration), resulted in dormancy expression. In achenes from the commercial hybrid, in contrast, the main limitation to germination resulted mostly from the presence of the pericarp that represents a severe restraint when the activity of pericarp-microbial is enhanced by a high incubation temperature. This thesis allowed the development of a technological tool which can be applied at an industrial scale, which was the use of sodium hypochlorite (oxidant agent). This thesis also raised the possibility of applying a treatment of fungicides and bactericides during seed coating treatments in seed industry.

**Keywords:** Dormancy, sunflower, pericarp, temperature, abscisic acid (ABA), hypoxia, microbial activity.



# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción general: Revisión de antecedentes y presentación del problema**



## CAPÍTULO 1

### Introducción general: Revisión de antecedentes y presentación del problema

#### 1.1. Introducción

##### 1.1.1. Dormición: Definición y su impacto sobre los cultivos

La dormición de las semillas es una característica adaptativa compleja determinada principalmente por factores genéticos pero con una sustancial influencia del ambiente (i.e., factores exógenos) durante el desarrollo de la semilla (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006) y su expresión depende mayoritariamente de las condiciones ambientales durante la imbibición de la semilla (Hoang et al., 2014). Se han propuesto diversas definiciones sobre la dormición, que se han ido modificando con los avances sobre los mecanismos involucrados en este carácter. De aquí en más, se utilizará la definición propuesta por Benech-Arnold et al. (2000): La dormición es una condición interna de la semilla que impide su germinación bajo condiciones hídricas, térmicas y gaseosas que, de lo contrario, hubieran sido apropiadas para la germinación. Esta definición incorpora el concepto de que se trata de un bloqueo interno de las semillas, a diferencia de las definiciones acuñadas hasta el momento que no distinguían entre efectos que podían ser propios del ambiente de aquellos propios de la semilla. La medición de la dormición se realiza de manera indirecta a través de la ausencia de germinación en semillas viables incubadas bajo las condiciones mencionadas por Benech-Arnold et al. (2000). La dormición es una característica frecuente en semillas de especies silvestres (Finkelstein et al., 2008) que optimiza la distribución de la germinación en el tiempo (Kermode, 2005), evitando que esta ocurra fuera de la estación de crecimiento (Finkelstein et al., 2008) y, asimismo, durante períodos cortos de condiciones favorables en una estación desfavorable para el crecimiento de las plantas (Née et al., 2017), asegurando la supervivencia de la próxima generación (Finkelstein et al., 2008). A pesar de esta evidente importancia adaptativa, la dormición es una característica indeseable para la agricultura (Bewley, 1997). Por ejemplo, una dormición persistente puede afectar la emergencia de los cultivos y el número de plantas establecidas (Benech-Arnold et al., 2000), impactando sobre el rendimiento (Roselló et al., 2016). La dormición representa un problema importante para las empresas de semillas porque implica un retraso sustancial para la siembra inmediata y dificulta la comercialización, principalmente para la contra estación (Roselló et al., 2016). Por consiguiente, el proceso de domesticación ha tendido a remover este carácter en las especies cultivo, presente en sus antecesores silvestres (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Kilian et al., 2009).

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un buen modelo para estudiar la dormición ya que usualmente sus aquenios (i.e., frutos) están profundamente dormidos a cosecha (Corbineau y Côme, 2003; Benech-Arnold, 2004). En programas de mejoramiento, esto limita el número de ciclos del cultivo por año y también conduce a la asincronía en el tiempo a floración, restringiendo la oportunidad de hacer cruces entre plantas (Marchetti, 2012). Por ello, es crucial eliminar la dormición en genotipos que aún la tienen.

##### 1.1.2. Clasificaciones de la dormición

La literatura ofrece diversas clasificaciones de la dormición. Una primera clasificación hace referencia al momento en que se impone o adquiere la dormición, pudiéndose dividir en dormición primaria y secundaria; la primera es aquella dormición innata que

poseen las semillas cuando son dispersadas de la planta madre (i.e., la dormición se impone durante la maduración de la semilla), mientras que la dormición secundaria hace referencia a la dormición a la que son inducidas semillas no dormidas, muchas veces como resultado de haber estado expuestas a condiciones desfavorables para la germinación o a la dormición a la que son re-inducidas semillas después de haber alcanzado una dormición suficientemente baja (Batlla y Benech-Arnold, 2010). Otra clasificación es la propuesta por Baskin y Baskin (2004), quienes dividen a la dormición en fisiológica, morfológica, morfo-fisiológica, física y una combinación de fisiológica y física. La dormición fisiológica se caracteriza por la acción de reguladores del crecimiento (i.e., hormonas) sobre el potencial de crecimiento del embrión y/o sobre la resistencia de los tejidos que se oponen a este crecimiento. Este tipo de dormición es el más frecuente en semillas de especies de hábitats templados (e.g., de las familias de las Asteráceas, Solanáceas, Crucíferas). La mayoría de las especies utilizadas como modelos para estudiar dormición (e.g., *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Avena fatua* y varios cereales) presentan este tipo de dormición. La dormición morfológica, por su parte, se observa en semillas cuyos embriones, aunque diferenciados, están subdesarrollados y, por lo tanto, son pequeños. Estos embriones necesitan más tiempo para crecer y completar su diferenciación morfológica para luego germinar. Estas semillas carecen de dormición fisiológica y su período de dormición es el tiempo transcurrido entre la incubación de semillas frescas y la aparición de la radícula. La dormición morfo-fisiológica, en cambio, se registra en semillas que, además de tener embriones subdesarrollados, tienen un componente de dormición fisiológica. Estas semillas requieren más tiempo para germinar que semillas con dormición morfológica. La dormición física, por su parte, es causada por una o más capas de células en empalizada impermeables al agua, correspondientes a tejidos que recubren al embrión. Y, por último, hay semillas que presentan una combinación de dormición fisiológica y física.

La dormición fisiológica, a su vez, puede estar impuesta a nivel de diferentes tejidos. En efecto, puede estar impuesta por las cubiertas (i.e., tejidos que recubren al embrión), impuesta al embrión, o estar impuesta por las cubiertas y el embrión (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En la dormición impuesta al embrión, el mismo no es capaz de germinar, incluso si es aislado del resto de la estructura de la semilla (Bewley y Black, 1994). Las causas de la dormición embrionaria pueden ser tanto la inmadurez del embrión como la presencia de inhibidores en el mismo (e.g., ácido abscísico) incapaces de salir al medio acuoso ni siquiera cuando el embrión es incubado en forma aislada (Bewley y Black, 1994). Por el contrario, en la dormición impuesta por las cubiertas, la semilla entera no es capaz de germinar; sin embargo, el embrión es capaz de germinar si es aislado del resto de la estructuras de la semilla (Bewley y Black, 1994; Bewley, 1997). Las causas de la dormición por cubiertas pueden ser: restricción a la salida de inhibidores, restricción a la entrada de agua, restricción al intercambio gaseoso, restricción mecánica a la expansión del embrión o presencia de inhibidores en las cubiertas (Bewley y Black, 1994).

La dormición referida a una semilla individual es una propiedad de todo o nada; en cambio, cuando se hace referencia a una población de semillas es pertinente hablar de “niveles de dormición” (Batlla et al., 2004). Excepto para las poblaciones que presentan dormición absoluta y que, por lo tanto, no germinan bajo ninguna condición, la dormición es un fenómeno relativo (i.e., se expresa bajo algunas condiciones y no bajo otras) lo que determina que el nivel de dormición de una población de semillas se establezca como el rango de condiciones ambientales permisivas para la germinación (Batlla y Benech-Arnold, 2010). De esta manera, un nivel de dormición bajo se

caracteriza por un amplio rango de condiciones ambientales permisivas para la germinación, mientras que un alto nivel de dormición implica un estrecho rango de condiciones ambientales permisivas para la germinación. Una condición ambiental es, por ejemplo, la temperatura de incubación; en este caso la dormición relativa se pone de manifiesto como la capacidad de germinar a ciertas temperaturas pero no a otras temperaturas (Batlla y Benech-Arnold, 2015). La dormición absoluta, en cambio, es la incapacidad de la semilla de germinar a cualquier temperatura (Batlla y Benech-Arnold, 2015).

### 1.1.3. Regulación hormonal de la dormición

La dormición fisiológica está sujeta a control hormonal. Ha sido demostrado que el ácido abscísico (ABA) participa tanto en la inducción de la dormición durante la maduración de las semillas como en el mantenimiento de la dormición en semillas embebidas (Bewley, 1997; Finkelstein et al., 2002; Liu et al., 2010). El ABA se sintetiza a partir de la ruta de los carotenoides (Finkelstein, 2013). El contenido de S(+)-ABA (forma fisiológicamente activa) está regulado a través de un balance entre su síntesis y catabolismo, teniendo un papel regulatorio las enzimas 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa y ABA-8'-hidroxilasa, respectivamente (Millar et al., 2006; Graeber et al., 2012). La señalización del ABA, en cambio, es mucho más compleja que su metabolismo y sus componentes no se han identificado en su totalidad (Finkelstein, 2013). La acumulación de ABA en el desarrollo de las semillas es baja durante los estadios tempranos, luego aumenta a mediados del desarrollo, alcanza un máximo alrededor de madurez fisiológica y disminuye cuando el grano se somete a desecación (Bewley y Black, 1994; Bewley, 1997; Kermode, 2005). Según la literatura para *Arabidopsis thaliana* y otras especies, sería este pico de acumulación de ABA durante la maduración el que determinaría que luego las semillas presenten dormición aun cuando, en el momento de la dispersión, tengan un contenido de ABA apenas detectable. Karssen et al. (1983) demostraron con mutantes de contenido de ABA que tanto el mutante como el *wild type* (i.e., genotipo salvaje) tienen ABA casi indetectable a cosecha; sin embargo, el mutante de contenido, al no haber acumulado ABA durante el llenado, no tiene dormición mientras que el *wild type* sí la tiene. Le Page-Degivry et al. (1990) observaron lo mismo para girasol, utilizando fluridone (i.e., un inhibidor de la biosíntesis de ABA) en lugar de mutantes de contenido de ABA. Como se menciona más arriba, el ABA también está involucrado en el mantenimiento de la dormición durante la imbibición (Debeaujon y Koornneef, 2000; Grappin et al., 2000; Ali-Rachedi et al., 2004). En este sentido, en semillas que presentan dormición, la concentración de ABA suele aumentar por síntesis *de novo* cuando son embebidas (Ali-Rachedi et al., 2004).

Está ampliamente documentado que el ABA y las giberelinas (GAs) cumplen un papel antagónico (promoción de la germinación) en el control de la germinación en especies que poseen dormición fisiológica (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La transición de semillas dormidas a no dormidas se caracteriza por una disminución en la sensibilidad al ABA y un incremento en la sensibilidad a las GAs, siendo, en cambio, el balance ABA/GAs lo que determina la expresión de la dormición durante la imbibición de las semillas en muchas especies (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

El papel del etileno (ET) en la dormición es menos conocido que el del ABA y el de las GAs (Matilla y Matilla-Vázquez, 2008). Estudios que utilizaron mutantes de *Arabidopsis thaliana* de respuesta a ET mostraron que el ET endógeno promueve la germinación de semillas por disminución de la sensibilidad al ABA endógeno (Beaudoin et al., 2000). Por lo tanto, el ET actúa antagónicamente al ABA (Corbineau

et al., 2014). A su vez, el ET actúa en conjunto con las GAs en el proceso de emergencia de la radícula, aunque la participación de las GAs parece ser cuantitativa y cualitativamente más importante (Matilla y Matilla-Vázquez, 2008).

#### **1.1.4. Relación entre dormición y disponibilidad de oxígeno al embrión**

Los diferentes tejidos que recubren al embrión pueden imponer dormición a través de la interferencia con el intercambio gaseoso (e.g., entrada de oxígeno y/o salida de dióxido de carbono) (Corbineau y Côme, 1995). Este impedimento al intercambio de gas, que da como resultado la restricción de oxígeno al embrión (i.e., hipoxia), puede, a su vez, interferir con el metabolismo y sensibilidad de inhibidores de la germinación (Bewley y Black, 1982; Benech-Arnold et al., 2006). En efecto, es conocido que la actividad de la enzima ABA 8'-hidroxilasa está implicada en el catabolismo del ABA (Cutler et al., 2000), y esta actividad es severamente reducida con concentraciones de oxígeno menores a 10% (Krochko et al., 1998). Asimismo, Benech-Arnold et al. (2006) demostraron que la condición de hipoxia puede incrementar la sensibilidad embrionaria al ABA en cebada. Esta restricción de la difusión de oxígeno por parte de las cubiertas depende de propiedades físicas, como son la estructura y espesor de estas cubiertas, y también de propiedades bioquímicas de estas cubiertas (Corbineau y Côme, 1995). En frutos enteros, la restricción de oxígeno al embrión puede deberse a la oxidación de compuestos fenólicos, mediada por la actividad de la enzima polifenol oxidasa, como ocurre en cebada (Lenoir et al., 1986). En cuanto a la restricción de oxígeno al embrión, la literatura muestra que los agentes oxidantes eliminan la dormición, como es el caso del hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno en cariopses con glumas de sorgo de alepo (Benech-Arnold et al., 1992) y peróxido de hidrógeno en embriones aislados y granos intactos de cebada (Wang et al., 1998). Asimismo, la respiración de microorganismos presentes en la superficie del fruto también puede estar involucrada en la limitación de la difusión de oxígeno al embrión por competencia con este gas (Heydecker y Chetram, 1971). Esta disponibilidad de oxígeno, a su vez, se encuentra regulada por el factor temperatura. A altas temperaturas hay mayor actividad de la polifenol oxidasa y mayor respiración de microorganismos, acompañado de una reducción en la solubilidad del oxígeno en fase acuosa (Hoang et al., 2013).

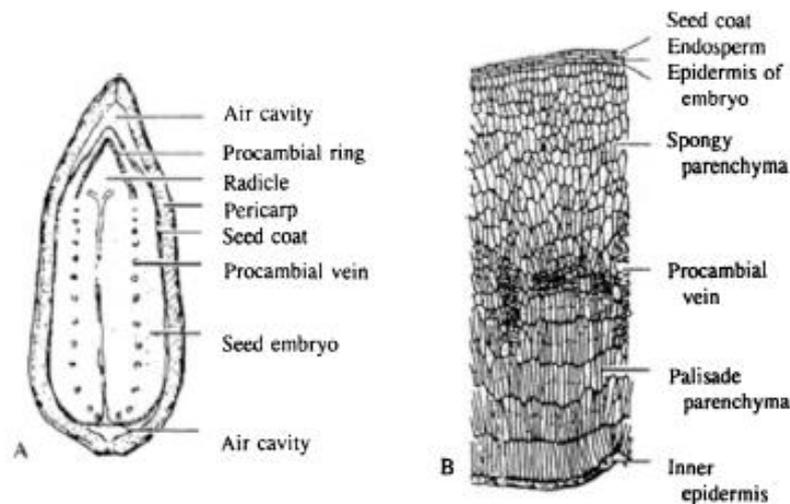
#### **1.1.5. La especie objeto de estudio: *Helianthus annuus* L. (girasol)**

##### **1.1.5.1. Origen, distribución e importancia económica**

El girasol es un importante cultivo oleaginoso que pertenece a la familia de las Asteráceas, originario de Norte América (Bukhsh et al., 2011), donde data su centro de domesticación primario (Harter et al., 2004; Smith, 2006). Es un cultivo de verano (Allinne et al., 2009) producido en zonas templadas, que se puede adaptar a una variedad de condiciones climáticas y de suelo (Canavar et al., 2010), lo que le permite estar muy disperso geográficamente (Black et al., 2006). Ocupa un lugar importante en la agricultura del mundo (Anton et al., 2015) dado que es un cultivo que combina alto rendimiento con alta calidad del aceite extraído de sus semillas (Razi y Assad, 1999). Es uno de los cultivos oleaginosos más importantes, con una superficie cultivada de 25 millones de hectáreas en todo el mundo y con una producción anual que asciende a 36 millones de toneladas métricas, concentrada principalmente en la Federación de Rusia, Ucrania, Unión Europea y Argentina, siendo Argentina, a su vez, el cuarto productor y el tercer exportador de aceite a nivel mundial (Filippi et al., 2015).

### 1.1.5.2. Descripción del fruto

El fruto de girasol es un aquenio de ovario ínfero denominado cipsela que consiste en una semilla y un pericarpio no soldado a la semilla (Seiler, 1997, Figura 1. 1). La semilla se desarrolla a partir de un óvulo fertilizado, mientras que el tejido materno derivado de la pared del ovario experimenta cambios morfológicos que, junto al receptáculo, generan el pericarpio maduro (Esau, 1977). El pericarpio consiste en una epidermis, hipodermis, capa de fitomelanina, capa media (compuesta de diez a quince capas de células orientadas axialmente) y parénquima (compuesto de paredes delgadas, de células adyacentes a la epidermis interna). En frutos maduros, la esclerificación de la capa media disminuye hacia el centro y parte del parénquima interno, los haces vasculares y la epidermis interna colapsan (Lindström et al., 2007). El pericarpio comprende entre el 20-25% del peso del fruto (Connor y Hall, 1997). Por su parte, la semilla consiste en una cubierta seminal, una sola capa de endosperma y el embrión (Seiler, 1997). La cubierta seminal es delgada y tiene tres capas, una interior y otra exterior de parénquima, y una capa media de parénquima esponjoso. El endosperma consiste mayoritariamente en una única capa de células de aleurona que se encuentran unidas a la cubierta de la semilla. El embrión se compone principalmente de dos cotiledones. Éste consiste en gran parte de parénquima en empalizada, con células ricas en aceite, grandes partículas de aleurona y cristales de proteínas (Seiler, 1997). Por tanto, los tejidos que recubren al embrión (i.e., cubiertas) en esta especie son el pericarpio (pared del ovario más receptáculo), la cubierta seminal y el endosperma.



**Figura 1. 1.** Sección longitudinal de un aquenio de girasol, que muestra el pericarpio y la semilla, 4<sup>x</sup> (A). Sección transversal de un cotiledón de una semilla; la epidermis interna será la superficie superior del cotiledón cuando la semilla germine, 28<sup>x</sup> (B). Redibuja por Seiler (1997) de Pustovoit (1975).

### 1.1.5.3. El proceso de domesticación sobre la dormición

Hace más de 10 mil años las sociedades humanas de todo el mundo pasaron de la recolección de las plantas silvestres a la agricultura (Doebley et al., 2006) y esta transición generó una interacción creciente entre los humanos y las plantas; esta interacción llevó al proceso que se conoce como domesticación (Vaughan et al., 2007). Este proceso implicó una selección direccional intensa (Wills y Burke, 2007) por rasgos que aumentan la productividad y utilidad de las plantas en relación con sus progenitores silvestres (Meyer y Purugganan, 2013; Olsen y Wendel, 2013). Es así como, actualmente, las plantas domesticadas forman la base de la oferta mundial de alimentos

(Baute et al., 2015). El proceso de mejoramiento de especies cultivo continúa hasta hoy (Doebley et al., 2006).

Las plantas domesticadas generalmente se clasifican como tales porque poseen, por lo menos, un subconjunto de una serie de rasgos que constituyen el "síndrome de domesticación" que las distinguen de sus progenitores silvestres (Hammer, 1984; Gross y Olsen, 2010). Algunos de estos rasgos son: aumento en el tamaño del fruto o grano, incremento de la dominancia apical, pérdida de mecanismos de dispersión en semillas, pérdida de dormición en semillas o pérdida de protección contra herbívoros, que son considerados rasgos desventajosos en plantas silvestres (Doebley et al., 2006; Vaughan et al., 2007; Gross y Olsen, 2010). El girasol domesticado moderno proporciona un ejemplo clásico de síndrome de domesticación en plantas ya que, morfológicamente, tiene un único gran capítulo y semillas grandes, sin dispersión a madurez, en contraste con su progenitor silvestre que tiene muchos capítulos chicos y semillas pequeñas que se dispersan a la madurez (Burke et al., 2002). Además, el girasol domesticado tiene alterado el tiempo a floración y el contenido de aceite en relación con su progenitor (Burke et al., 2005; Blackman et al., 2011). Sin embargo, en este cultivo la selección de cierto tipo de características trajo aparejado la selección inconsciente de otros rasgos como es la dormición de las semillas (Heiser, 1988; Reuzeau y Cavalié, 1997; Chibani et al., 2006), que, tal como se mencionó antes, es considerado un rasgo indeseable para la agricultura (Bewley, 1997). La historia de domesticación del girasol tiene aproximadamente 4.800 años y es relativamente corta si se la compara con la cebada que tiene 10.000 años, el maíz que tiene entre 7.000 y 9.000 años o el arroz que tiene 8.000 años (Doebley et al., 2006; Price, 2009). Durante la corta historia de domesticación del girasol, no ha sido posible eliminar totalmente la dormición de sus aquenios (Rodríguez et al., 2011). Además, el girasol presenta una importante variabilidad intraespecífica para el rasgo dormición (Subrahmanyam et al., 2002; Maiti et al., 2006).

Particularmente, en el caso de Argentina, la historia de la introducción de germoplasma foráneo y la adaptación de este cultivo en el país está estrechamente relacionada con los flujos migratorios. Las primeras siembras de girasol fueron hechas por inmigrantes judíos que habían traído aquenios del sur de Rusia. Después de eso, la introducción de materiales tempranos procedentes de Rusia, Canadá y Rumania, así como también la introgresión con especies de *Helianthus* silvestres, permitió el surgimiento del germoplasma argentino, que tiene una particular constitución genética y está bien adaptado a las condiciones de crecimiento (Bertero de Romano y Vázquez, 2003; Moreno et al., 2013). La introducción de heterosis, la incorporación de la esterilidad masculina citoplasmática y el diseño de líneas restauradoras de la fertilidad permitió el desarrollo de los híbridos de girasol, con mayor rendimiento y calidad potencial, alta homogeneidad, sincronización del tiempo a madurez y mejor adaptación a condiciones de campo (Filippi et al., 2014).

El germoplasma del girasol argentino es considerado un valioso recurso genético a nivel mundial, que incluye diferentes líneas (Filippi et al., 2015). Sin embargo, el conocimiento sobre los niveles de variabilidad del germoplasma argentino sigue siendo escaso, haciendo incompleto el mapa global de la diversidad de girasol cultivado (Filippi et al., 2015). Actualmente, Argentina junto con Europa Occidental y Estados Unidos, concentra los principales programas de mejoramiento de girasol (Vear, 2016), donde la genética y la fisiología del rasgo dormición son áreas activas de investigación (de Estrada et al., 2012). El principal objetivo subyacente de los programas de mejoramiento de girasol es desarrollar híbridos F1 de alto rendimiento (Golabadi et al., 2015) con alta calidad de aceite (contenido y composición) (van der Merwe et al.,

2013). Sin embargo, la dormición en este cultivo es un inconveniente importante que causa un grave problema en la producción eficiente de sus semillas (Maiti et al., 2006). El éxito de un programa de mejoramiento depende de la variabilidad de los materiales iniciales, por lo tanto, la selección de los parentales es la etapa más importante de cualquier programa para lograr desarrollar nuevas variedades con rasgos deseables (Purwati y Herwati, 2016). La variabilidad híbrida puede ser dividida en sus componentes, que son la línea hembra, la línea masculina, y la interacción línea hembra por línea masculina (de la Vega et al., 2007). Lograr líneas parentales homocigotas en cortos períodos es de gran importancia en los programas de mejoramiento (Dagustu et al., 2012), como también lo es su multiplicación para la realización de los posteriores cruzamientos y obtención de semillas híbridas comerciales. En general, sólo se puede realizar un ciclo del cultivo de girasol al año debido a las condiciones ambientales imperantes a campo en muchos países (Dagustu et al., 2012), como es el caso de Argentina. Por tanto, sembrar en contra estación es una metodología implementada para lograr más de un ciclo de este cultivo por año. Debido a que la dormición representa un retraso sustancial para la siembra inmediata, limitando el número de ciclos por año (Roselló et al., 2016), es una necesidad imperiosa para el mejoramiento de esta especie contar con líneas parentales que no presenten dormición.

#### **1.1.5.4. Dormición en esta especie**

Los aquenios de girasol recién cosechados presentan una combinación de dormición embrionaria y dormición por cubiertas, alcanzando muy bajos niveles de germinación (Corbineau et al., 1990). Si las semillas se secan y almacenan después de su recolección (i.e., post-maduración), van perdiendo la dormición al embrión (Corbineau et al., 1990). La post-maduración provoca, entre otros efectos, la disminución en la capacidad de acumular ABA sintetizado *de novo* (al disminuir la capacidad de síntesis o aumentar la capacidad de catabolizarlo) combinada con una reducción de la sensibilidad de los embriones al ABA (Kucera et al., 2005). A diferencia de la dormición embrionaria, la dormición impuesta por cubiertas puede persistir por un tiempo prolongado (Benech-Arnold, 2004). A su vez, las semillas de girasol presentan dormición relativa, por lo que la dormición se expresa sólo a determinadas temperaturas de incubación (Bewley y Black, 1994). En esta especie puede trazarse una asociación entre el tejido que impone la dormición y las temperaturas a las que se expresa esta dormición relativa. Es así como la inhibición de la germinación a bajas temperaturas de incubación (i.e., 10°C a 15°C) puede ser el resultado de dormición embrionaria y/o dormición impuesta por cubiertas (Bodrone et al., 2017), mientras que la inhibición de la germinación a altas temperaturas (i.e., 25°C a 30°C) pone en evidencia dormición impuesta por las cubiertas (Corbineau et al., 1990).

La mayoría de los estudios realizados sobre dormición en girasol se han llevado a cabo con genotipos que presentan dormición embrionaria. Le Page-Degivry et al. (1990) demostraron que este tipo de dormición es inducida por ABA durante el desarrollo de la semilla. A su vez, el mantenimiento de este tipo de dormición se atribuyó a la capacidad del eje embrionario para sintetizar ABA *de novo* durante la imbibición de la semilla (Le Page-Degivry y Garello, 1992). Posteriormente, Bianco et al. (1994) correlacionaron la liberación de la dormición embrionaria durante el almacenamiento en seco con una disminución en la capacidad de biosíntesis de ABA. Años más tarde, Garello et al. (2000) investigaron los cambios en el patrón de proteínas solubles asociadas a la liberación de la dormición embrionaria. Si bien existe abundante bibliografía sobre dormición embrionaria en girasol, ésta es de más fácil eliminación y menos persistente que la dormición impuesta por cubiertas. Por ello, llama la atención que escasas

investigaciones se hayan llevado a cabo sobre los tejidos que recubren al embrión que participan en la dormición por cubiertas. A pesar del importante problema que la dormición representa para la producción de este cultivo, y sobre todo para las empresas semilleras, la mayoría de los estudios fisiológicos, moleculares y genéticos no han considerado debidamente el papel que los distintos tejidos que recubren al embrión tienen en la imposición de la dormición (Graeber et al., 2012). Por este motivo, esta tesis estudiará la dormición en *Helianthus annuus* L. impuesta por cubiertas, haciendo foco en el papel del pericarpio y buscará desarrollar tecnologías que permitan eliminarla a escala industrial.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

Dilucidar los mecanismos fisiológicos involucrados en el control de la dormición en aquenios de girasol (*Helianthus annuus* L.) y derivar tecnologías para su eliminación a escala industrial.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- 1) Identificar los tejidos (i.e., pericarpio, cubierta seminal, endosperma y/o embrión) responsables de la imposición de la dormición y, ligado a esto, la temperatura a la cual se expresa esa dormición.
- 2) Analizar el posible papel del pericarpio en la imposición de una condición de hipoxia al embrión a alta temperatura de incubación (30°C) y, consecuentemente, estudiar en qué medida la hipoxia inhibe la germinación a esa temperatura. Forma parte del mismo objetivo: i) evaluar si esta inhibición está mediada por interferencias en el metabolismo de ABA y/o alteraciones en la sensibilidad a esta hormona y ii) dilucidar la naturaleza de una eventual restricción a la llegada de oxígeno al embrión impuesta por el pericarpio.
- 3) Determinar el efecto del hipoclorito de sodio (agente oxidante) sobre la germinación de aquenios a altas temperaturas de incubación (25°C y 30°C) y evaluar su impacto sobre el metabolismo de ABA. Ligado a este objetivo, generar tecnologías de manejo post-cosecha que permita eliminar la dormición y que sea aplicable a escala industrial.

## **1.3. Hipótesis de trabajo**

- 1) En aquenios con dormición impuesta por el pericarpio, la presencia del mismo impone una condición de hipoxia al embrión, afectando el metabolismo del ABA.
- 2) La condición de hipoxia al embrión, impuesta por el pericarpio, interfiere con la sensibilidad de los embriones al ABA.

#### **1.4. Estructura de la tesis**

La presente tesis se estructura en cinco capítulos. El Capítulo 1 (Introducción general: Revisión de antecedentes y presentación del problema) plantea el tema a abordar, releva la información bibliográfica existente, describe la especie objeto de estudio, y enuncia los objetivos e hipótesis. Los Capítulos 2 (El papel del pericarpio en la expresión de la dormición en aquenios de girasol), 3 (Efecto del hipoclorito de sodio aplicado a escala industrial para eliminar la dormición impuesta por el pericarpio) y 4 (La expresión de la dormición a altas temperaturas: Su relación con el aumento de la sensibilidad a la hipoxia y la actividad microbiana) comprenden los resultados experimentales derivados de esta tesis, junto con su respectiva introducción, materiales y métodos y discusión. Finalmente, en el Capítulo 5 (Discusión general) se contrastan las hipótesis planteadas en el Capítulo 1, se discuten los resultados de manera conjunta y vinculada, se concluyen los aportes de esta tesis y se comentan las implicancias para futuras investigaciones.



## **CAPÍTULO 2**

# **El papel del pericarpio en la expresión de la dormición en aquenios de girasol**



## CAPÍTULO 2

### El papel del pericarpio en la expresión de la dormición en aquenios de girasol

#### Resumen

Los aquenios de girasol (*Helianthus annuus* L.) con frecuencia presentan dormición impuesta por el pericarpio, la cual es de larga duración y causa serios problemas para la industria semillera. En este capítulo se evaluó una línea endocriada con este tipo de dormición. Los objetivos fueron: i) evaluar la germinación de distintos lotes de aquenios y determinar el efecto de los diferentes tejidos que recubren al embrión (entre ellos el pericarpio) sobre la imposición de la dormición, ii) estudiar la anatomía de pericarpios, iii) determinar el efecto de la temperatura de incubación sobre la expresión de la dormición, iv) explorar las bases fisiológicas a partir de las cuales el pericarpio impone dormición y, para ello, se evaluó la acumulación de ácido abscísico (ABA) en el embrión durante la incubación de semillas y/o aquenios a diferentes temperaturas y la sensibilidad embrionaria al ABA durante la incubación de semillas a diferentes temperaturas y v) determinar el efecto de etileno, giberelinas y fluridone sobre la eliminación de la dormición. La dormición estuvo impuesta sólo por el pericarpio y su expresión fue evidente únicamente a altas temperaturas de incubación (i.e., 25°C y 30°C). A su vez, los aquenios que fueron incubados inicialmente a 30°C por cierto tiempo y luego fueron incubados a 12°C por el resto del período de incubación, alcanzaron mayores porcentajes de germinación cuanto menor fue el tiempo de exposición a alta temperatura. Los lotes de aquenios de esta línea alcanzaron, en su mayoría, similares porcentajes de germinación dentro de cada temperatura de incubación, independientemente del ambiente, definido por la campaña, el sitio de producción y la fecha de siembra. La estructura de los pericarpios entre las diferentes campañas prácticamente no difirió entre sí, por lo que el ambiente materno no produjo cambios anatómicos del pericarpio. La incubación a 30°C aumentó la sensibilidad de las semillas al ABA pero no implicó un aumento en el contenido de esta hormona con respecto a la incubación a baja temperatura (i.e., 12°C). La adición de etileno o giberelinas a los aquenios permitió la eliminación de la dormición embrionaria a 25°C y 30°C, al igual que el fluridone en aquenios incubados a 30°C.



## 2.1. Introducción

Una semilla presenta dormición cuando no tiene la capacidad de germinar en incubación bajo una combinación de condiciones ambientales que, de otro modo, serían favorables para su germinación (Baskin y Baskin, 2004). La dormición de las semillas es mayormente hereditaria y permite optimizar la distribución de la germinación en el tiempo, previniendo que esta ocurra bajo condiciones desfavorables para el establecimiento de las plántulas (Kermode, 2005). A pesar de su indudable importancia adaptativa, la dormición es una característica indeseable para la agricultura (Bewley, 1997). Una dormición persistente puede afectar la emergencia del cultivo y el número de plantas establecidas (Benech-Arnold et al., 2000), impactando en el rendimiento del cultivo (Roselló et al., 2016). Debido a esto, la domesticación y el mejoramiento han tendido a eliminar este carácter presente en sus ancestros silvestres (Bewley, 1997). El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un importante cultivo oleaginoso (Anton et al., 2015; Filippi et al., 2015; Nasreen et al., 2015) cuya historia de domesticación relativamente corta no ha resultado en reducciones en la dormición de sus semillas (Rodríguez et al., 2011).

Los aquenios (i.e., frutos) de algunos genotipos de girasol a menudo presentan dormición fisiológica a cosecha (Rodríguez et al., 2011), lo que perjudica la emergencia del cultivo, causando dificultades en la producción comercial (Snow et al., 1998; Nasreen et al., 2015).

La dormición fisiológica puede estar impuesta por las cubiertas (i.e., tejidos que recubren al embrión), deberse a que la misma está impuesta al embrión, o ser una combinación de ambas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En el girasol la dormición fisiológica a cosecha obedece a una combinación de dormición embrionaria y dormición por cubiertas (Benech-Arnold, 2004) y si las semillas son secadas y almacenadas a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad relativa 50%) la dormición embrionaria es eliminada rápidamente (Corbineau et al., 1990; Andrade et al., 2015); sin embargo, la dormición por cubiertas puede persistir por varias semanas e incluso meses (Benech-Arnold, 2004). Por cubiertas se hace referencia a cualquier tejido que recubra al embrión (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Szemruch et al., 2014) y, en el caso del girasol, son el pericarpio, la cubierta seminal y el endosperma.

El girasol presenta, a su vez, dormición relativa, lo que implica que la dormición se expresa a ciertas temperaturas y no a otras (Bewley y Black, 1994). La literatura muestra que la dormición embrionaria en este cultivo se expresa a bajas temperaturas de incubación (i.e.,  $10^\circ\text{C}$  a  $15^\circ\text{C}$ ) mientras que la dormición por cubiertas se puede expresar a bajas o a altas temperaturas (i.e.,  $25^\circ\text{C}$  a  $40^\circ\text{C}$ ) (Corbineau et al., 1990; Bodrone et al., 2017). La mayoría de los estudios sobre dormición en girasol han sido conducidos con genotipos que presentan dormición embrionaria a pesar de que, como se dijo más arriba, este tipo de dormición es menos persistente y más fácil de eliminar que la dormición impuesta por el pericarpio (Bodrone et al., 2017).

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal que se identificó por primera vez a principios de la década de 1960 (Cutler et al., 2010). Desde entonces, se ha demostrado que el ABA regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluida la dormición de las semillas (Finkelstein, 2013). Como se mencionó en el primer capítulo, esta hormona participa tanto en la inducción de la dormición (durante la maduración de las semillas) como en el mantenimiento de la dormición (en semillas embebidas) (Bewley, 1997; Finkelstein et al., 2002; Liu et al., 2010). Para la inducción de la dormición, se requieren de adecuados niveles endógenos de ABA durante el desarrollo de las semillas; por el contrario, una deficiencia de ABA durante esta etapa está asociada con la ausencia de dormición en la semilla madura al momento de la

dispersión (i.e., ausencia de dormición primaria) (Nambara y Marion-Poll, 2003). Por otra parte, el ABA mantiene la dormición cuando ocurre síntesis *de novo* de esta hormona en semillas embebidas (Ali-Rachedi et al., 2004). En la terminación de la dormición no sólo participan cambios en el contenido de ABA (i.e., balance entre su síntesis y catabolismo) sino que también involucra cambios en la señalización de esta hormona. Por ejemplo en el caso de la cebada, la terminación de la dormición de los granos se encuentra estrechamente correlacionada con la disminución de la sensibilidad de los embriones al efecto inhibitorio del ABA sobre la germinación (Benech-Arnold et al., 1999).

La dormición embrionaria en girasol es usualmente eliminada con etileno (ET), el cual antagoniza el efecto del ABA (Corbineau et al., 1990), y también es eliminada con fluridone, un inhibidor de la biosíntesis de ABA (Yamazaki et al., 1999). Las giberelinas (GAs) tienen efectos antagónicos al ABA y promueven la terminación de la dormición (Holdsworth et al., 2008), tal como lo demostraron Le Page-Degivry et al. (1996) al aplicar bajas concentraciones de esta hormona en el medio de incubación de embriones de girasol con pocos días de almacenamiento en seco. En girasol, la expresión de la dormición a altas temperaturas (e.g., 45°C) ha sido asociada con la reducida producción de ET (Corbineau et al., 1988). Los resultados sostienen la hipótesis de que la inducción de la dormición secundaria se debe a la incapacidad para convertir el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), un compuesto intermediario en la producción de ET, a ET. Por otra parte, la germinación de semillas pre-incubadas a 45°C fue estimulada por el ácido 2-cloroetil fosfónico (etefón), mientras que ACC o GA<sub>3</sub> no tuvieron efecto (etefón, disuelto en agua, es absorbido y transportado por la planta liberando ET lentamente). Curiosamente, a pesar de ser la dormición impuesta por el pericarpio más problemática que la dormición embrionaria para la producción de los cultivos, no han sido dilucidados los mecanismos subyacentes a este tipo de dormición en girasol.

La dormición impuesta por el pericarpio está presente en el germoplasma silvestre (Heiser, 1951; Heiser et al., 1969; Heiser, 1976), complica la reproducción del germoplasma elite x el silvestre (Chandler y Jan, 1985; Seiler, 1992) y obstaculiza la multiplicación de semillas en la preservación de germoplasma y en los programas de mejoramiento de especies silvestres (Gandhi et al., 2005). Según la literatura, los tejidos que recubren al embrión, entre ellos el pericarpio, pueden imponer dormición a través de la limitación de la entrada de oxígeno al embrión (i.e., hipoxia) (Corbineau y Côme, 1995). Esta limitación de oxígeno al embrión puede, a su vez, interferir con el metabolismo y sensibilidad de inhibidores de la germinación (Bewley y Black, 1982; Benech-Arnold et al., 2006). La restricción a la difusión de este gas depende de las propiedades físicas (estructura y espesor) y bioquímicas de las cubiertas (Corbineau y Côme, 1995). Diferentes investigaciones han demostrado que distintos genotipos exhiben diferencias en la estructura del pericarpio, la cual se compone de epidermis, hipodermis, esclerénquima y parénquima (Lindström et al., 2000), encontrándose variaciones en especial en lo que respecta al esclerénquima (Denis et al., 1994). A su vez, si bien los factores genéticos son importantes para determinar la constitución del pericarpio, el ambiente y las prácticas de manejo también pueden afectarlo (Baldini y Vannozzi, 1996). El fundamento de cómo los tejidos que recubren al embrión, entre ellos el pericarpio, pueden contribuir a imponer dormición, es aún poco conocido (Bodrone et al., 2017). En este sentido, una buena comprensión de estos fundamentos podría conducir a aplicaciones prácticas en los cultivos (Née et al., 2017).

Sobre esta base, este capítulo aborda estudios llevados a cabo con una línea endocriada con dormición impuesta por el pericarpio con el fin de cumplir los siguientes objetivos:

i) evaluar la germinación de diferentes lotes de aquenios pertenecientes a distintas campañas, sitios de producción y fechas de siembra y, asimismo, determinar el efecto de los diferentes tejidos que recubren al embrión (entre ellos el pericarpio) sobre la imposición de la dormición, ii) estudiar la anatomía de pericarpios pertenecientes a aquenios de distintas campañas de producción en un mismo sitio, de manera de establecer correlaciones con eventuales diferencias en el comportamiento germinativo de los distintos lotes, iii) determinar el efecto de la temperatura de incubación sobre la expresión de la dormición, iv) explorar las bases fisiológicas a partir de las cuales el pericarpio impone dormición, para lo cual se evaluó la acumulación de ABA en el embrión durante la incubación de semillas y/o aquenios a diferentes temperaturas y la sensibilidad embrionaria al ABA durante la incubación de semillas a diferentes temperaturas y v) estudiar la posibilidad de atenuar esta dormición impuesta por el pericarpio con agentes externos usualmente usados para dormición embrionaria como son etileno, giberelinas y fluridone.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Material vegetal y terminología utilizada**

Se utilizaron aquenios de girasol de una línea endocriada productora de aceite que fueron generados por Dow AgroSciences (Ruta 8, km 264, CP 2720, Colón, Buenos Aires, Argentina). Los aquenios fueron enviados por la empresa inmediatamente luego de la cosecha con 6,6% de contenido de humedad y se almacenaron a  $-30^{\circ}\text{C}$  para preservar el nivel de dormición inicial (Oracz et al., 2008; Bazin et al., 2011). Esta línea endocriada es usada como parental macho para donante de polen de múltiples híbridos comerciales para aceite y presenta una dormición persistente que perjudica a la industria semillera (M. Gerbaldo, Dow AgroSciences, comunicación personal, 2010). El problema de la dormición está ligado fundamentalmente a que la industria necesita multiplicar a esta línea para obtener su polen y así fecundar a otras plantas (usadas como parentales femeninos) para obtener los híbridos (que la industria vende como simiente a los productores). Los lotes de aquenios fueron producidos en distintos ambientes: en los sitios Colón ( $33^{\circ}53'S$ ,  $61^{\circ}06'O$ ) e Hilario Ascasubi ( $39^{\circ}22'S$ ,  $62^{\circ}38'O$ ) en la provincia de Buenos Aires (Argentina) y Luján de Cuyo ( $33^{\circ}1'S$ ,  $68^{\circ}52'O$ ) en la provincia de Mendoza (Argentina), en distintas campañas (2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012, habiendo sido la primer campaña sólo en Luján de Cuyo) y fechas de siembra (una fecha de siembra, aunque en ocasiones hubo dos o tres (ver Figura 2. 1). En los experimentos a continuación detallados en los que no se aclara el lote utilizado, se refiere al lote perteneciente al sitio de producción Luján de Cuyo de la campaña 2009/2010 en la única fecha de siembra debido a que fue el primer lote entregado por Dow AgroSciences con el que se comenzaron a diseñar y realizar los experimentos.

En la presente tesis aquenio se refiere al fruto de girasol que consiste en una semilla y un pericarpio no soldado a la semilla, semilla se refiere a la cubierta seminal, endosperma y embrión, y embrión se refiere al embrión aislado, según Seiler (1997) (ver Figura 1. 1 del capítulo anterior). Se utilizaron aquenios del tercio externo y medio del capítulo de girasol que se obtuvieron mediante el empleo de un tamiz de tajo (estos aquenios quedaron sobre el tamiz; mientras que los que se eliminaron fueron los que pasaron a través del tamiz que tuvieron un tamaño menor a 2,75 mm). Las temperaturas de incubación de  $12^{\circ}\text{C}$  (i.e., baja temperatura),  $25^{\circ}\text{C}$ - $30^{\circ}\text{C}$  (i.e., altas temperaturas) fueron experimentadas para permitir que la dormición impuesta por el pericarpio sea

diferencialmente expresada (Bodrone et al., 2017). Se consideró que un aquenio, semilla o embrión había germinado cuando la elongación de la radícula alcanzó los 2-3 mm.

La empresa Dow AgroSciences luego de la cosecha seca los aquenios hasta llevarlos a 6,6% de humedad (por protocolo) y en esta tesis se partió de este valor. Se aclara que el contenido de humedad al que se lleva al aquenio luego de la cosecha tiene efecto sobre la dormición, pudiendo eliminarse la dormición embrionaria (y que esa dormición embrionaria no es re-adquirida en casos de re-humedecimiento), pero no la dormición por cubiertas.

Los lotes de aquenios utilizados a lo largo de toda la tesis fueron ensayados con un test de tetrazolio (2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro) para conocer la viabilidad de sus semillas. En este test sólo aquellos tejidos que están vivos y respiran adquieren un color rojo intenso de manera localizada, lo que permite distinguir semillas viables, que se colorean de rojo, de aquellas semillas no viables, que no se colorean (cabe destacar que este test no sirve para distinguir entre semillas dormidas de no dormidas, sólo evalúa viabilidad). Para ello se incubaron semillas (es decir, aquenios sin pericarpio) en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada a 12°C durante 24 h. Luego, de estas mismas semillas, se obtuvieron embriones (es decir, semillas sin cubierta seminal ni endosperma) y, a su vez, algunos embriones fueron cortados longitudinalmente. Posteriormente, semillas, embriones, embriones cortados longitudinalmente, cubierta seminal y endosperma fueron incubados en cuatro réplicas de veinticinco, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de solución de tetrazolio (0,2 g de tetrazolio en 20 ml de agua destilada) en oscuridad durante 24 h a 30°C. La totalidad de las semillas, embriones, embriones cortados longitudinalmente, cubierta seminal y endosperma se tiñeron de color rojo, lo que significa que los tejidos estaban vivos y, por lo tanto, eran viables las semillas.

### **2.2.2. Germinación de aquenios pertenecientes a distintos ambientes, a distintas temperaturas de incubación**

Aquenios (i.e., aquenios intactos) de la línea endocriada pertenecientes a distintos ambientes, definidos por distintas combinaciones de campañas (2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012), sitios de producción (Colón, Hilario Ascasubi y Luján de Cuyo) y fechas de siembra (una fecha de siembra por sitio, aunque en ocasiones hubo dos o tres) fueron incubados a 12°C (i.e., baja temperatura), 25°C (i.e., alta temperatura) y 30°C (i.e., alta temperatura) para evaluar la expresión de la dormición. La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada, con cuatro réplicas de 25 aquenios. El porcentaje de germinación se registró diariamente durante 20 d.

### **2.2.3. Estructura del pericarpio por microscopía óptica**

Se utilizaron aquenios pertenecientes al sitio Luján de Cuyo de distintas campañas de producción (2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012), donde hubo una única fecha de siembra por campaña, para analizar la estructura del pericarpio de estos aquenios por microscopía óptica. La elección de estos aquenios para esta medición se debió a que en la mayoría de los ensayos de la tesis se usó el lote perteneciente a Luján de Cuyo de la campaña 2009/2010, por lo que se buscó comparar la campaña de este sitio con las dos subsiguientes. Los aquenios fueron cortados en la región central con una hoja de afeitar limpia para obtener finas rebanadas (aproximadamente 2 mm de espesor) e inmediatamente fueron fijadas en formaldehído-alcohol-acético por 48 h. Las rebanadas fueron deshidratadas en una serie de diluciones etanol-xilol y luego infiltradas y

embebidas en parafina (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Posteriormente, el material fue cortado transversalmente y en serie (10-12  $\mu\text{m}$  de espesor) utilizando un micrótomo rotativo tipo Minot, las secciones fueron teñidas con safranina-fast green y montadas en bálsamo de Canadá (Johansen, 1940). Las variables medidas de la estructura del pericarpio fueron el número de capas de células del esclerénquima y el espesor del mismo ( $\mu\text{m}$ ) en seis aquenios por campaña de producción, con tres mediciones por aquenio. Para ello, las secciones fueron fotografiadas con un microscopio óptico Zeiss Axioplan (Oberkochen, Alemania) y analizadas con el software Zeiss AxioCam ERc 5s (Jena, Alemania).

#### **2.2.4. Efecto de la temperatura de incubación y de los diferentes tejidos que recubren al embrión sobre la expresión e imposición de la dormición, respectivamente**

Aquenios (i.e., aquenios intactos), semillas (i.e., aquenios sin pericarpio) y embriones (i.e., semillas sin cubierta seminal ni endosperma) de la línea endocriada fueron incubados a 12°C (i.e., baja temperatura), 25°C (i.e., alta temperatura) y 30°C (i.e., alta temperatura) para determinar los tejidos responsables de la imposición de la dormición y la temperatura a la cual se expresa esa dormición. La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada, con cuatro réplicas de 25 aquenios, semillas o embriones. El porcentaje de germinación se registró diariamente durante 20 d.

Se llevó a cabo otro ensayo para evaluar si la temperatura de 30°C (i.e., alta temperatura) sólo permitía que los aquenios expresaran dormición o si esa temperatura además inducía a dormición secundaria. Para ello, se incubaron aquenios de esta línea endocriada en agua destilada durante: i) 15 d a 30°C, ii) 5 d a 30°C y luego 10 d a 12°C, iii) 3 d a 30°C y luego 12 d a 12°C y iv) 15 d a 12°C. La incubación se llevó a cabo con el mismo sistema experimental descrito arriba, con cuatro réplicas de 25 aquenios. El porcentaje de germinación se registró: al final del período de incubación para los tratamientos de temperatura constante durante toda la incubación (i.e., tratamientos “i” y “iv”); y al final del período de incubación a cada temperatura para los tratamientos que consistieron en dos temperaturas contrastantes a lo largo de la incubación (i.e., tratamientos “ii” y “iii”).

Para lograr discernir con precisión cuál o cuáles de los diferentes tejidos que recubren al embrión (i.e., pericarpio, cubierta seminal y endosperma) imponen dormición, es que estos tejidos fueron eliminados o dañados mecánicamente, utilizando un bisturí y una lupa. Para realizar el daño en la cubierta seminal y el endosperma, las semillas previamente se colocaron durante 30 min en cajas de Petri con un disco de papel de filtro humedecido con 3 ml de agua destilada. Posteriormente, los siguientes tratamientos fueron incubados en agua destilada, con el mismo sistema experimental descrito arriba, a 25°C y 30°C, con cuatro réplicas de 25: aquenios (i.e., A), aquenios con un corte lateral que afectó la mitad del largo del pericarpio hacia el eje embrionario (i.e., Pd), aquenios con un corte lateral que afectó la mitad del largo del pericarpio hacia el eje embrionario sumado a un daño en la cubierta seminal y el endosperma (i.e., Pd+CSd+Ed), y aquenios después de la eliminación del pericarpio pero sin dañar la cubierta seminal ni el endosperma (i.e., S). El porcentaje de germinación se registró después de 20 d de incubación.

### **2.2.5. Contenido embrionario de ABA en semillas y aquenios a diferentes temperaturas de incubación**

El contenido embrionario de ABA fue medido en la línea endocriada a través de dos experimentos: i) aquenios y semillas incubados a 30°C y ii) aquenios incubados a 12°C y 30°C. La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada, con tres réplicas de 25 aquenios o semillas.

Para la determinación de ABA, se tomaron muestras de quince semillas y/o aquenios de cada experimento a diferentes tiempos de incubación antes de la germinación de la primera semilla o aquenio. Posteriormente, estas semillas y aquenios fueron diseccionados para obtener embriones, congelados en nitrógeno líquido, y almacenados a -80°C hasta ser liofilizados. Luego cada muestra fue liofilizada, molida con un mortero, pesada y almacenada a -30°C hasta realizarse la determinación del contenido embrionario de ABA. Para la determinación, a cada muestra se le agregó agua destilada (100:1 v/p) y se la dejó durante toda la noche sobre un agitador a 4°C. Después cada muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 4 min y se analizaron 50 µl del sobrenadante por muestra *in duplo* con un radioinmunoensayo como se describe en Steinbach et al. (1995) usando un anticuerpo mono-clonal AFR MAC 252 (Quarrie et al., 1988), y ABA tritiado (Amersham Biosciences, Reino Unido). Se calculó la media y el error estándar de la media de tres réplicas, cada una evaluada *in duplo*.

Paralelamente a estos dos experimentos de los cuales se tomaron muestras para la medición del contenido embrionario de ABA, se realizaron otros dos experimentos para medir el porcentaje de germinación de aquenios y semillas de cada tratamiento. De esta manera, se aseguró que la medición de ABA se llevara a cabo antes de que comience la germinación y también permitió relacionar el porcentaje de germinación con el contenido de ABA. Tres réplicas de cada tratamiento fueron incubadas (como en el caso del ensayo de medición de ABA) y se registró la germinación diariamente durante 20 d.

### **2.2.6. Sensibilidad embrionaria al ABA durante la incubación de semillas a diferentes temperaturas**

Semillas de la línea endocriada fueron incubadas a 12°C, 25°C y 30°C en agua destilada (i.e., control) y soluciones de ABA (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a concentraciones de 1, 10 y 100 µmol l<sup>-1</sup> ABA. La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada o solución hormonal, con tres réplicas de 25 semillas. Para las soluciones de ABA, el componente se disolvió en 1 mol l<sup>-1</sup> NaOH (hidróxido de sodio) de acuerdo con el protocolo <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/growth-regulators.html> provisto por Sigma-Aldrich. El porcentaje de germinación se registró después de 20 d de incubación.

### **2.2.7. Efecto del etileno y las giberelinas sobre la germinación de aquenios**

Aquenios de la línea endocriada fueron incubados a 25°C y 30°C en agua destilada, soluciones de Tifón (i.e., un componente liberador de etileno, Gleba S.A., Argentina) a concentraciones de 10, 100, y 500 µmol l<sup>-1</sup> Tifón y soluciones de GA<sub>3</sub> (i.e., giberelinas 3, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a concentraciones de 100 y 200 µmol l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada o solución hormonal, con cinco réplicas de 25 aquenios. Las soluciones de GA<sub>3</sub> fueron preparadas a partir de la disolución del componente en EtOH (etanol) de acuerdo con el protocolo

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/growth-regulators.html> provisto por Sigma-Aldrich.

#### **2.2.8. Efecto del fluridone sobre la germinación de aquenios**

Aquenios de la línea endocriada fueron incubados a 30°C en agua destilada, soluciones de fluridone (i.e., un inhibidor de la biosíntesis de ABA) a concentraciones de 5, 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{mol l}^{-1}$  fluridone. La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada o solución hormonal, con tres réplicas de 25 aquenios. Las soluciones fueron preparadas a partir de la disolución del componente en acetona 1% y luego la acetona fue evaporada.

#### **2.2.9. Análisis estadístico**

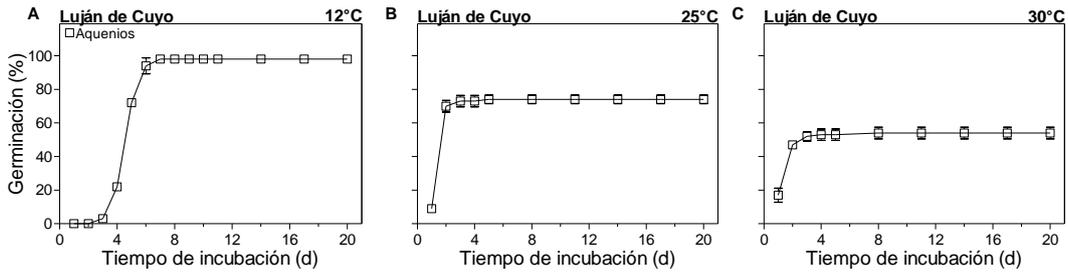
Se realizaron análisis de varianza (i.e., ANOVA) y test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ) utilizando el programa InfoStat 2014 (Di Rienzo et al., 2014). Para las figuras se usó GraphPad Prism 4.0 (Motulsky, 2003).

### **2.3. Resultados**

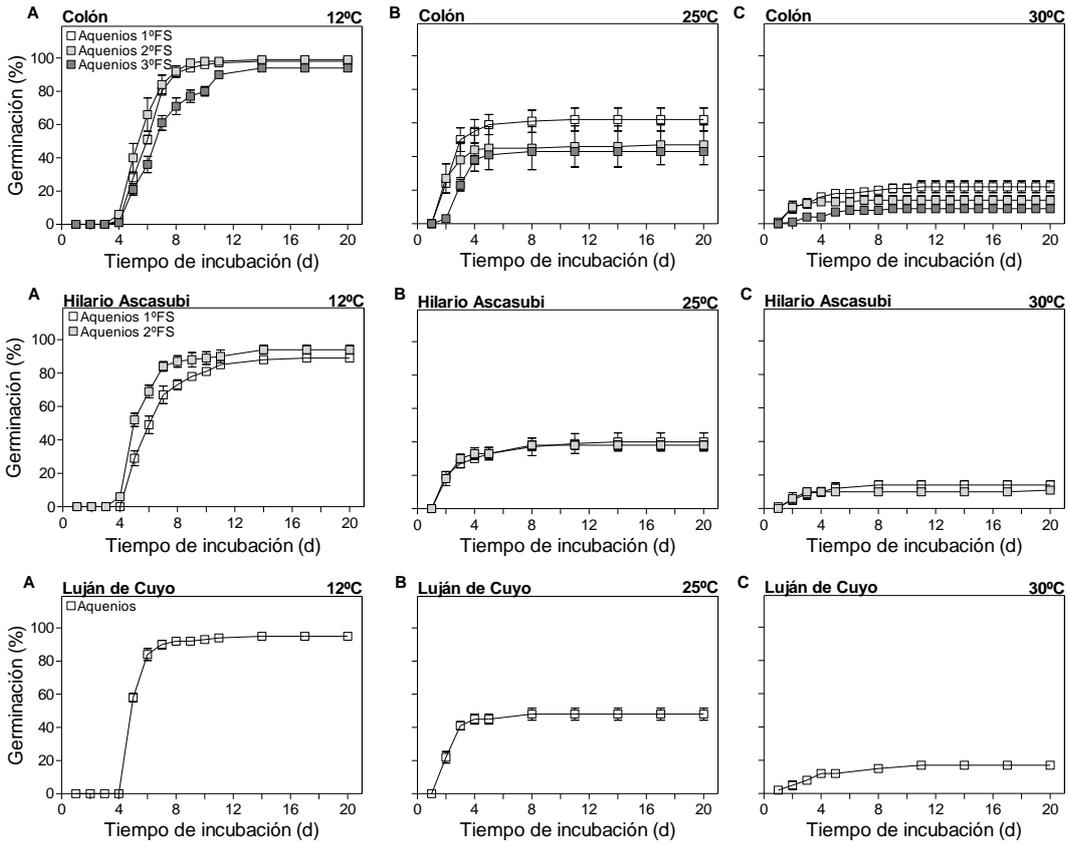
#### **2.3.1. Germinación de aquenios pertenecientes a distintos ambientes, a distintas temperaturas de incubación**

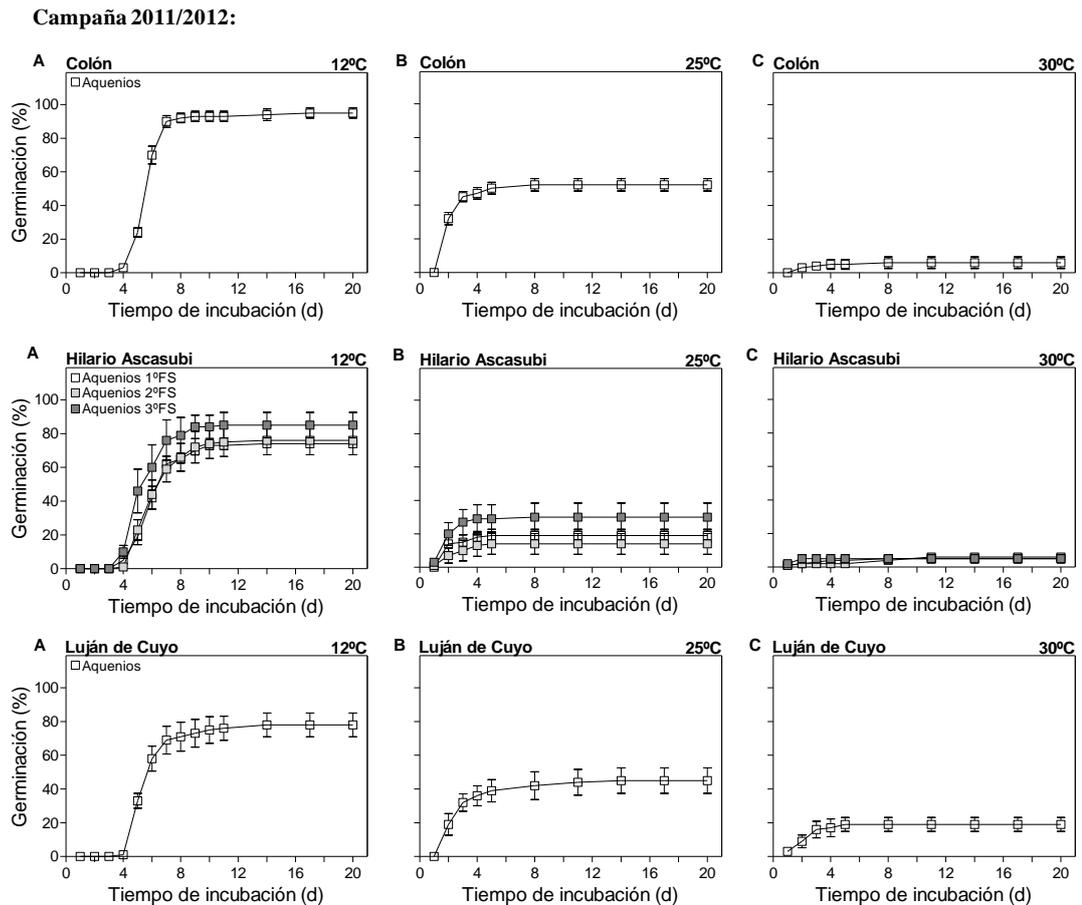
Aquenios de la línea endocriada correspondientes a distintos ambientes, definidos por distintas combinaciones de campañas (2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012), sitios de producción (Colón, Hilario Ascasubi y Luján de Cuyo) y fechas de siembra (una, aunque en ocasiones hubo dos o tres) exhibieron mayores porcentajes de germinación a 12°C, menores a 25°C y aún menores a 30°C (Figura 2. 1), demostrando expresión de la dormición a altas temperaturas de incubación. Los lotes de aquenios alcanzaron similares porcentajes de germinación dentro de cada temperatura de incubación, independientemente del ambiente (definido por distintas combinaciones de campañas, sitios de producción y fechas de siembra), a excepción de los aquenios de la campaña 2009/2010 en Luján de Cuyo incubados a 25°C y 30°C que presentaron porcentajes de germinación algo mayores (Figura 2. 1).

**Campaña 2009/2010:**



**Campaña 2010/2011:**

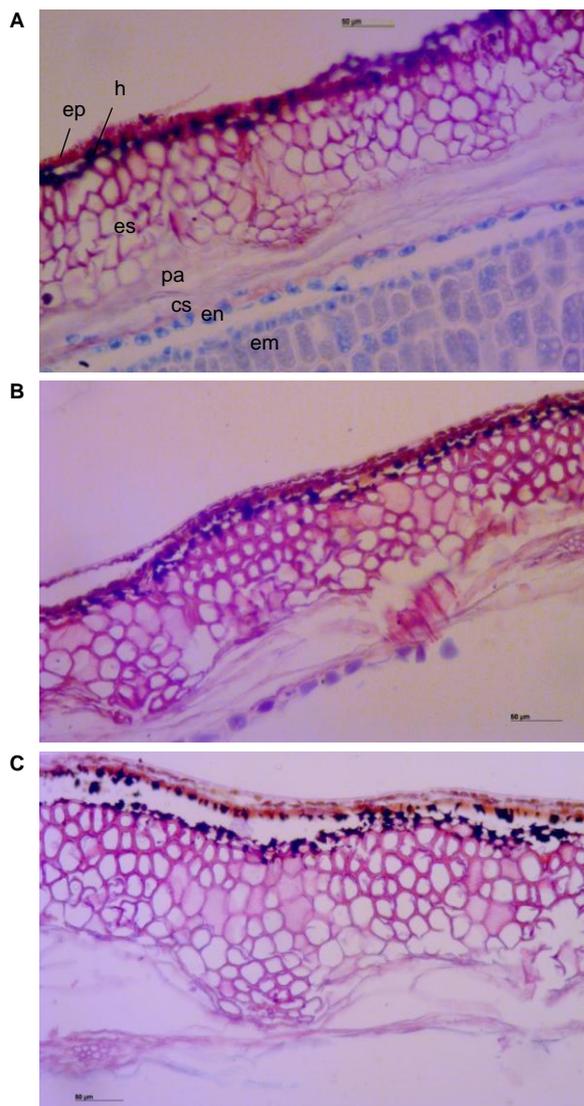




**Figura 2. 1.** Germinación (%) de achenes de la línea endocriada pertenecientes a distintos ambientes, definidos por distintas combinaciones de campañas (2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012), sitios de producción (Colón, Hilario Ascasubi y Luján de Cuyo) y fechas de siembra (FS) (una fecha de siembra aunque en ocasiones hubo dos o tres), incubados en agua destilada a 12°C (A), 25°C (B) y 30°C (C). Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### 2.3.2. Estructura del pericarpio por microscopía óptica

Se evaluó por microscopía óptica la estructura de pericarpios de achenes de la línea endocriada pertenecientes al sitio de producción Luján de Cuyo de la campaña 2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012 (Figura 2. 2) y los resultados no mostraron diferencias significativas en el número de capas de células del esclerénquima (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 2. 1); sin embargo, el espesor del esclerénquima ( $\mu\text{m}$ ) de los achenes de la campaña 2010/2011 fue menor al de los achenes de las otras dos campañas (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 2. 1).



**Figura 2. 2.** Secciones transversales de la parte central de aquenios de la línea endocriada pertenecientes al sitio Luján de Cuyo de la campaña de producción 2009/2010 (A), 2010/2011 (B) y 2011/2012 (C). Abreviaturas: ep, epidermis; h, hipodermis; es, esclerénquima; pa, parénquima; cs, cubierta seminal; en, endosperma; em, embrión. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

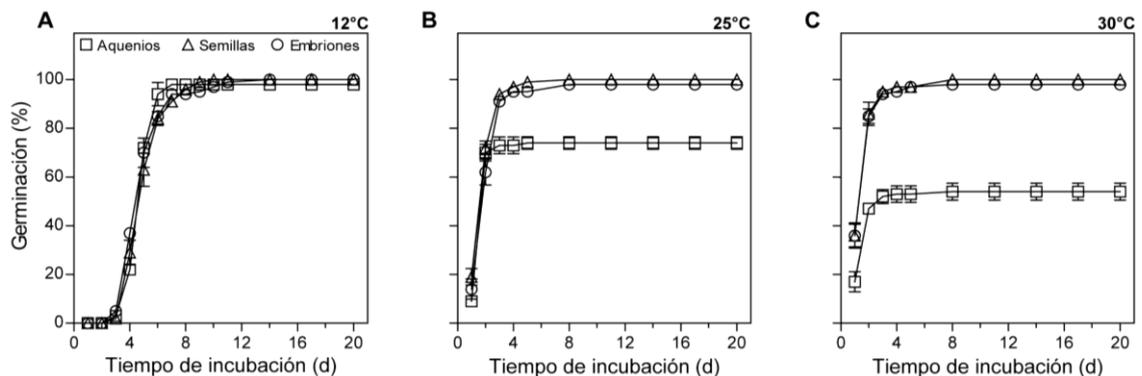
**Cuadro 2. 1.** Número de capas de células del esclerénquima y espesor del esclerénquima ( $\mu\text{m}$ ) de aquenios pertenecientes al sitio Luján de Cuyo de la campaña de producción 2009/2010, 2010/2011 y 2011/2012. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para seis aquenios por campaña de producción, con tres mediciones por aquenio.

<b>Campaña de producción</b>	<b>Número de capas de células del esclerénquima<sup>†</sup></b>	<b>Espesor del esclerénquima (<math>\mu\text{m}</math>)<sup>†</sup></b>
2009/2010	7,0 $\pm$ 0,2 a	148,9 $\pm$ 3,6 a
2010/2011	7,1 $\pm$ 0,2 a	116,1 $\pm$ 3,2 b
2011/2012	7,6 $\pm$ 0,3 a	152,4 $\pm$ 3,8 a

<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

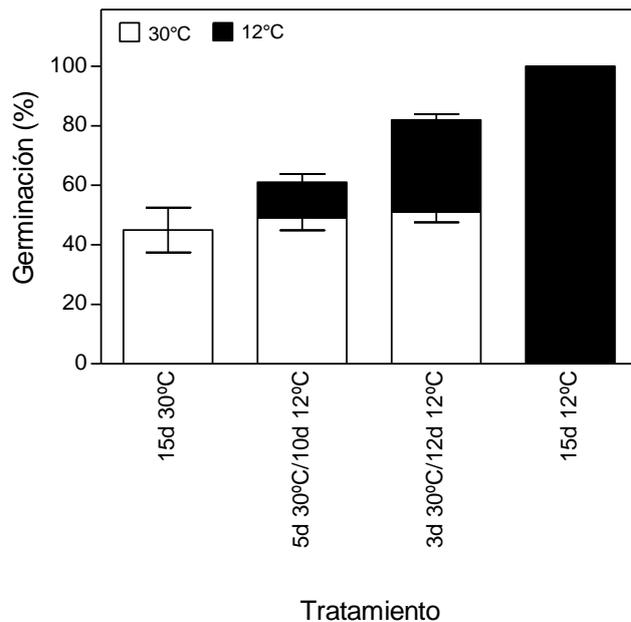
### 2.3.3. Efecto de la temperatura de incubación y de los diferentes tejidos que recubren al embrión sobre la expresión e imposición de la dormición, respectivamente

Semillas y embriones de la línea endocriada alcanzaron el 100% de germinación independientemente de la temperatura de incubación (Figura 2. 3), lo que indica que dormición embrionaria no existe en este lote de aquenios en este estadio, y que la cubierta seminal y el endosperma no inhibieron la germinación. Por el contrario, los aquenios sólo alcanzaron el 100% de germinación cuando la incubación fue a 12°C (Figura 2. 3A); la germinación total de aquenios a 25°C y 30°C fue significativamente reducida a 75% y 50%, respectivamente, en comparación con la germinación de semillas y embriones (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Figura 2. 3 B y C). Esto pone de relieve que la dormición impuesta por el pericarpio se expresó cuando los aquenios fueron incubados a 25°C y 30°C, pero no cuando fueron incubados a 12°C.



**Figura 2. 3.** Germinación (%) de aquenios, semillas y embriones de la línea endocriada incubados en agua destilada a 12°C (A), 25°C (B) y 30°C (C). Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.

Los aquenios de la línea endocriada incubados durante 15 d a 12°C no expresaron dormición (Figura 2. 4). Por el contrario, los aquenios incubados durante 3, 5 y 15 d a 30°C alcanzaron valores de alrededor de 50% de germinación al cabo de la incubación a esa temperatura (Figura 2. 4). Cuando los aquenios incubados inicialmente a 30°C durante 5 y 3 d fueron luego incubados a 12°C por el resto del período de incubación, se observó que el porcentaje de germinación aumentó durante la incubación a baja temperatura (Figura 2. 4). Esto demuestra que la incubación a 30°C permitió que los aquenios expresaran dormición y, además, la incubación a 30°C indujo a dormición secundaria a una fracción de la población que fue la que no germinó luego de estar incubada a 30°C y posteriormente incubada a 12°C. A su vez, los aquenios alcanzaron mayor porcentaje de germinación cuanto menor fue el tiempo de exposición a alta temperatura (Figura 2. 4).



**Figura 2. 4.** Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada incubados en agua destilada después de 15 d a 30°C, 5 d a 30°C y luego 10 d a 12°C, 3 d a 30°C y luego 12 d a 12°C y 15 d a 12°C. Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el espesor de la línea.

Cuando se llevaron a cabo tratamientos que consistieron en la eliminación o daño de los tejidos que recubren al embrión se vio que en la incubación a 25°C la germinación de Pd y Pd+CSd+Ed fue significativamente mayor en comparación con A (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 2. 2) y similar a S. En la incubación a 30°C los dos tratamientos de daño y el de eliminación del pericarpio (i.e., S) tuvieron un porcentaje de germinación significativamente mayor en comparación con A (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 2. 2); sin embargo, a 30°C el tratamiento de menor intensidad de daño (i.e., Pd) no fue suficiente para producir una germinación similar a la de S. Estos resultados indican que la imposición de la dormición fue debida principalmente al pericarpio, aunque la cubierta seminal y el endosperma pueden tener algún efecto ya que Pd difirió significativamente de S a 30°C (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 2. 2); sin embargo, esto último fue observado sólo a la más alta temperatura de incubación.

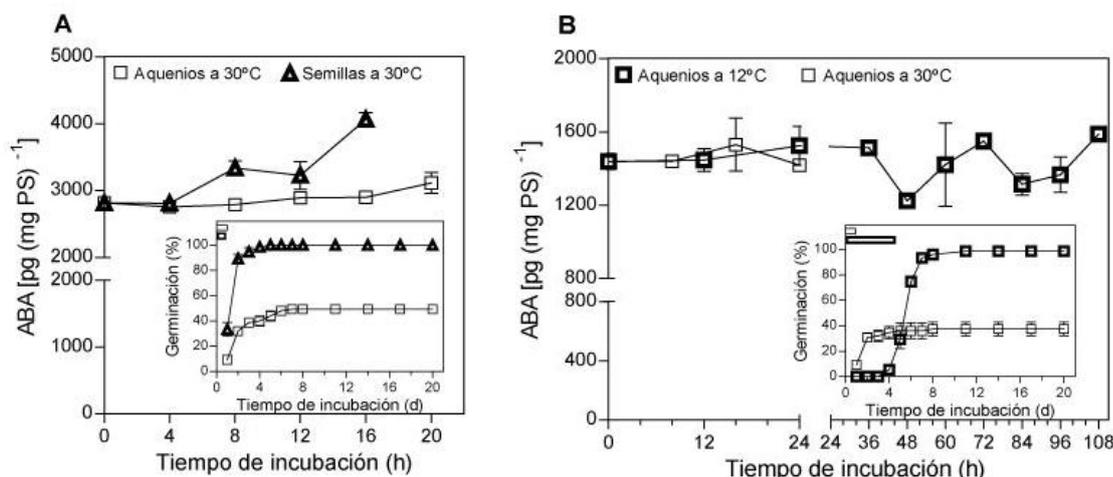
**Cuadro 2. 2.** Germinación (%) de aquenios (i.e., A), aquenios con un corte lateral que afectó la mitad del largo del pericarpio hacia el eje embrionario (i.e., Pd), aquenios con un corte lateral que afectó la mitad del largo del pericarpio hacia el eje embrionario sumado a un daño en la cubierta seminal y el endosperma (i.e., Pd+CSd+Ed) y aquenios después de la eliminación del pericarpio pero sin dañar la cubierta seminal ni el endosperma (i.e., S), pertenecientes a la línea endocriada, después de 20 d de incubación a 25°C y 30°C en agua destilada. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para cuatro réplicas.

Tratamiento	Germinación (%) <sup>†</sup>	
	A 25°C	A 30°C
A	75,0 $\pm$ 4,4 b	47,0 $\pm$ 5,7 c
Pd	97,0 $\pm$ 1,0 a	80,0 $\pm$ 5,4 b
Pd+CSd+Ed	90,0 $\pm$ 4,2 a	87,0 $\pm$ 3,0 ab
S	96,0 $\pm$ 0,0 a	98,0 $\pm$ 1,2 a

<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

#### 2.3.4. Contenido embrionario de ABA en semillas y aquenios a diferentes temperaturas de incubación

El contenido embrionario de ABA de aquenios se mantuvo bastante constante durante la incubación a 30°C (Figura 2. 5). El contenido embrionario de ABA proveniente de semillas sometidas a la misma temperatura de incubación se mantuvo constante hasta las 4 h, pero luego comenzó a incrementar y alcanzó los 4000 pg (mg PS)<sup>-1</sup> a las 16 h después de comenzada la incubación (Figura 2. 5A). El contenido embrionario de ABA de aquenios incubados a 12°C y 30°C fue similar (Figura 2. 5B) a pesar de una marcada diferencia en el porcentaje final de germinación alcanzada a estas dos temperaturas de incubación (figura interna de Figura 2. 5B). Esto sugiere que el contenido embrionario de ABA de aquenios no fue afectado por la temperatura de incubación y no mostró relación con la diferente expresión de la dormición observada a 12°C y 30°C. Estos resultados, en su conjunto, indican que ni la dormición impuesta por el pericarpio ni su expresión a 30°C parecen ser causadas por alteraciones en el contenido de ABA, con respecto al que poseen semillas incubadas sin pericarpio o aquenios incubados a bajas temperaturas.



**Figura 2. 5.** Contenido embrionario de ABA durante la incubación en agua destilada. Aquenios y semillas incubados a 30°C (A) y aquenios incubados a 12°C y 30°C (B). Las barras representan el error estándar de la media para tres réplicas, cada una medida *in duplo*. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las figuras internas muestran la germinación (%) en agua destilada; sus barras representan el error estándar de la media para tres réplicas; y sus barras horizontales indican el período de muestreo para el contenido embrionario de ABA.

### 2.3.5. Sensibilidad embrionaria al ABA durante la incubación de semillas a diferentes temperaturas

A 12°C 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  ABA casi completamente suprimió la germinación de las semillas de la línea endocriada, mientras que a esta temperatura la incubación con 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  ABA sólo afectó ligeramente la germinación (Cuadro 2. 3). Por el contrario, 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  ABA fue suficiente para casi completamente suprimir la germinación cuando la incubación fue llevada a cabo a 25°C y 30°C (Cuadro 2. 3). Estos resultados sugieren que la incubación a altas temperaturas incrementa la sensibilidad de las semillas al ABA.

**Cuadro 2. 3.** Germinación (%) de semillas de la línea endocriada después de 20 d de incubación a 12°C, 25°C y 30°C en agua destilada (i.e., control) y soluciones de ácido abscísico (ABA) a concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  ABA. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para tres réplicas.

Tratamiento	Germinación (%) <sup>†</sup>		
	A 12°C	A 25°C	A 30°C
Control	98,7 $\pm$ 1,3 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a
1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA	100,0 $\pm$ 0,0 a	97,3 $\pm$ 1,3 a	100,0 $\pm$ 0,0 a
10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA	84,0 $\pm$ 4,0 b	14,7 $\pm$ 4,8 b	26,7 $\pm$ 1,3 b
100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA	14,7 $\pm$ 3,5 c	8,0 $\pm$ 2,3 b	16,0 $\pm$ 0,0 c

<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

### 2.3.6. Efecto del etileno y las giberelinas sobre la germinación de aquenios

La adición de Tifón o GA<sub>3</sub> a diferentes concentraciones condujo a una pérdida de la dormición impuesta por el pericarpio en aquenios de la línea endocriada a 25°C y 30°C (Cuadro 2. 4).

**Cuadro 2. 4.** Germinación (%) de achenios de la línea endocriada después de 20 d de incubación a 25°C y 30°C en agua destilada (i.e., control), soluciones de Tifón a concentraciones de 10, 100, y 500  $\mu\text{mol l}^{-1}$  Tifón, y soluciones de giberelinas ( $\text{GA}_3$ ) a concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{mol l}^{-1}$   $\text{GA}_3$ . Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para cinco réplicas.

Tratamiento	Germinación (%) <sup>†</sup>	
	A 25°C	A 30°C
Control	74,4 $\pm$ 3,2 c	47,2 $\pm$ 4,6 b
10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Tifón	88,8 $\pm$ 2,7 ab	84,0 $\pm$ 2,8 a
100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Tifón	86,4 $\pm$ 1,6 ab	88,0 $\pm$ 3,1 a
500 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Tifón	84,8 $\pm$ 2,7 bc	88,0 $\pm$ 1,8 a
100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ $\text{GA}_3$	96,8 $\pm$ 1,5 a	83,2 $\pm$ 4,3 a
200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ $\text{GA}_3$	93,6 $\pm$ 2,7 ab	89,6 $\pm$ 2,7 a

<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

### 2.3.7. Efecto del fluridone sobre la germinación de achenios

La adición de fluridone a achenios de la línea endocriada en concentraciones iguales o superiores a 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  permitió aumentar la germinación a 30°C de incubación con respecto al control (Cuadro 2. 5). Por el contrario, a 25°C de incubación, la adición de fluridone no evidenció diferencias significativas con respecto al control (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 2. 5).

**Cuadro 2. 5.** Germinación (%) de achenios de la línea endocriada después de 20 d de incubación a 30°C en agua destilada (i.e., control) y soluciones de fluridone a concentraciones de 5, 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{mol l}^{-1}$  fluridone. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para tres réplicas.

Tratamiento	Germinación (%) <sup>†</sup>	
	A 25°C	A 30°C
Control	78,7 $\pm$ 2,7 a	34,7 $\pm$ 7,1 c
5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ fluridone	69,3 $\pm$ 3,5 a	36,0 $\pm$ 6,1 bc
10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ fluridone	78,7 $\pm$ 6,7 a	46,7 $\pm$ 3,5 abc
50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ fluridone	80,0 $\pm$ 2,3 a	65,3 $\pm$ 5,3 a
100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ fluridone	78,7 $\pm$ 2,7 a	61,3 $\pm$ 2,7 ab
500 $\mu\text{mol l}^{-1}$ fluridone	85,3 $\pm$ 2,7 a	61,3 $\pm$ 6,7 ab

<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

## 2.4. Discusión

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un importante cultivo, principalmente por la calidad de su aceite para el consumo humano (Paniego et al., 2007), y la alta demanda hace que sea necesario aumentar la producción de su semilla (Vigliocco et al., 2017). Uno de los objetivos de la industria semillera es obtener una plántula de cada semilla y la dormición atenta contra esto, causando importantes pérdidas económicas (Snow et al.,

1998; Nasreen et al., 2015). Los principales problemas no resueltos en la ecofisiología del girasol, como es la dormición, limitan los esfuerzos para perfeccionar el manejo y el mejoramiento de este cultivo (Hall, 2001). Investigaciones anteriores habían hecho foco en el estudio de la dormición embrionaria en girasol (Bazin et al., 2011; El-Maarouf-Bouteau et al., 2015). Recientemente se han publicado algunos trabajos de investigación sobre el efecto del pericarpio en la expresión de la dormición en esta especie. Andrade et al. (2015) ampliaron el conocimiento sobre la estructura anatómica del pericarpio y las vías por las que las condiciones de almacenamiento y la imbibición temprana afectan de manera diferencial el contenido de hormonas en el pericarpio en líneas dormidas y no dormidas. Vigliocco et al. (2017) evaluaron cómo las condiciones de almacenamiento y la eliminación del pericarpio afectan el nivel de dormición en una línea de girasol con dormición impuesta por el pericarpio y proporcionaron información sobre las características morfológicas del pericarpio. Si bien hay algunos trabajos, la literatura es escasa en relación al estudio de la dormición impuesta por el pericarpio (Bodrone et al., 2017).

En este capítulo se evaluó una línea endocriada de girasol con dormición persistente y los resultados demostraron que esta dormición estuvo impuesta sólo por el pericarpio (hubo poca incidencia de otros tejidos que recubren al embrión) y su expresión fue evidente únicamente a altas temperaturas de incubación (i.e., 25°C y 30°C) (Figura 2. 1, Figura 2. 3 y Cuadro 2. 2). Cuando se evaluó si la alta temperatura de incubación (i.e., 30°C) sólo permitía que los achenios expresaran dormición o si esa temperatura además inducía a dormición secundaria, se observó que esta temperatura permitió que los achenios expresaran dormición y, además, indujo a dormición secundaria (Figura 2. 4). A su vez, los achenios que fueron incubados inicialmente a 30°C durante 5 y 3 d y fueron luego incubados a 12°C por el resto del período de incubación, alcanzaron mayores porcentajes de germinación cuanto menor fue el tiempo de exposición a alta temperatura (Figura 2. 4).

Factores genéticos son importantes para determinar la constitución del pericarpio, aunque el ambiente y las prácticas de manejo también pueden afectarlo (Baldini y Vannozzi, 1996). Los lotes de achenios de esta línea alcanzaron, en su mayoría, similares porcentajes de germinación dentro de cada temperatura de incubación, independientemente del ambiente (definido por distintas combinaciones de campañas, sitios de producción y fechas de siembra) (Figura 2. 1). Posteriormente, cuando se evaluó la estructura del pericarpio de achenios pertenecientes al sitio de producción Luján de Cuyo, si bien el espesor del esclerénquima fue menor para la campaña 2010/2011, no se evidenciaron diferencias en el número de capas de células del esclerénquima entre los achenios de las distintas campañas (Cuadro 2. 1). Por lo tanto, la estructura de los pericarpios entre las diferentes campañas prácticamente no difirió entre sí, por lo que el ambiente materno no produjo cambios anatómicos del pericarpio (Figura 2. 2 y Cuadro 2. 1). La constitución del pericarpio parecería haber respondido a aspectos genéticos, mayoritariamente, con poca influencia ambiental, como sostuvieron Lindström et al. (2000).

Los tejidos que recubren al embrión pueden imponer dormición a través de la limitación de la entrada de oxígeno al embrión (i.e., hipoxia) (Corbineau y Côme, 1995). Se ha demostrado que la limitación de oxígeno al embrión puede alterar el metabolismo del ABA a favor de su acumulación (Bewley y Black, 1982; Benech-Arnold et al., 2006), aunque en estos experimentos no se detectó ninguna diferencia significativa en el contenido de ABA durante la incubación a 30°C cuando se comparó semillas versus achenios (Figura 2. 5). En contraste, la sensibilidad de las semillas al ABA fue incrementada varias veces cuando la incubación se llevó a cabo a altas temperaturas

(Cuadro 2. 3), sugiriendo que la menor germinación a 25°C y 30°C puede explicarse, en parte, por un aumento en la sensibilidad al ABA. En efecto, un aumento en la respuesta al ABA se documentó en embriones de cebada dormidos expuestos a alta temperatura de incubación y bajas tensiones de oxígeno (Benech-Arnold et al., 2006). Un mecanismo que relaciona los niveles de oxígeno y la señalización del ABA fue recientemente descrito en *Arabidopsis* y cebada, el cual implica una vía de proteólisis dirigida (vía N-terminal). La actividad reducida de esta vía en niveles de oxígeno bajo permite un incremento de la respuesta al ABA a través de la estabilización del factor de respuesta a etileno ERFVII (por sus siglas en inglés) (Holman et al., 2009; Mendiando et al., 2015). Una vía similar podría estar operando en girasol, y además, podría ser un mecanismo común implicado en el aumento de la respuesta al ABA observado a altas temperaturas de incubación en muchas especies diferentes y, asimismo, podría promover bajas tensiones de oxígeno dentro del aqenio.

Cuando en esta línea endocriada con dormición impuesta por el pericarpio se evaluaron agentes externos, usualmente usados para eliminar dormición embrionaria, se observó que el etileno y las giberelinas resultaron eficaces para terminar parte de la dormición impuesta por el pericarpio (Cuadro 2. 4). Se ha demostrado que el etileno exógeno o los compuestos de liberación de etileno mejoran la germinación en numerosas especies (Corbineau y Côme, 1995) y que la dormición en girasol a altas temperaturas de incubación se asocia con una reducción de la producción de etileno (Corbineau et al., 1988). A su vez, también es conocido que las giberelinas mejoran la germinación de semillas dormidas de numerosas especies cuya dormición es eliminada con etileno, como es el caso del girasol (Corbineau et al., 2014). El fluridone aplicado a aquenios de esta línea endocriada también logró atenuar la dormición, pero sólo a la más alta temperatura de incubación (Cuadro 2. 5). Le Page-Degivry y Garello (1992) habían demostrado que el fluridone aumentaba la germinación en embriones de girasol con dormición embrionaria y aquí se encontró que también tiene efecto sobre la dormición impuesta por el pericarpio. En conclusión, la aplicación de agentes externos sobre aquenios disminuyó la sensibilidad del embrión a la restricción que impone el pericarpio.

Por lo tanto, el pericarpio impone dormición a altas temperaturas de incubación a través de un mecanismo fisiológico que aún no se ha determinado. Considerando que la disponibilidad de oxígeno al embrión por parte de las cubiertas depende de la estructura, el espesor y las propiedades bioquímicas de estos tejidos (Corbineau y Côme, 1995), el pericarpio presumiblemente podría imponer hipoxia al embrión.



**CAPÍTULO 3**  
**Efecto del hipoclorito de sodio aplicado a escala industrial para eliminar la dormición impuesta por el pericarpio**



## CAPÍTULO 3

### **Efecto del hipoclorito de sodio aplicado a escala industrial para eliminar la dormición impuesta por el pericarpio**

#### **Resumen**

El diseño de tecnologías para la eliminación de la dormición impuesta por el pericarpio a escala de industria semillera, debería estar fuertemente basada en el entendimiento de las bases fisiológicas determinantes de este tipo de dormición en aquenios de girasol. Este capítulo se llevó a cabo con una línea endocriada con dormición impuesta sólo por el pericarpio, cuya expresión fue evidente únicamente a altas temperaturas de incubación (i.e., 25°C y 30°C), para: i) evaluar el efecto del hipoclorito de sodio (agente oxidante) sobre la eliminación de la dormición, ii) explorar las bases fisiológicas a partir de las cuales el hipoclorito de sodio podría, eventualmente, terminar la dormición en aquenios incubados a altas temperaturas de incubación y, para ello, se evaluó la acumulación de ácido abscísico (ABA) en el embrión durante la incubación a 30°C de aquenios con y sin uso del agente oxidante, iii) determinar el impacto del efecto del pericarpio sobre la emergencia del cultivo a campo (evaluado a través del comportamiento del aquenio a campo) y iv) evaluar la factibilidad del uso del hipoclorito de sodio para eliminar la dormición aplicado a escala de industria semillera, medido a través de la emergencia a campo. La aplicación de hipoclorito de sodio a los aquenios aumentó la germinación a 30°C con respecto al control. En aquenios incubados a 30°C el contenido de ABA disminuyó durante la incubación cuando los mismos fueron tratados con hipoclorito de sodio. La aplicación de hipoclorito de sodio sobre un lote comercial de aquenios (i.e., lavado al 3% y 7%, después de que fueran aplicados los químicos que habitualmente utiliza la industria) resultó en mayor germinación comparada con controles dormidos no tratados. Los experimentos a campo mostraron que la dormición impuesta por el pericarpio redujo la emergencia del cultivo a campo. Sin embargo, el tratamiento de los aquenios con hipoclorito de sodio, dentro del habitual procedimiento que aplica la industria, mejoró la emergencia a campo.



### 3.1. Introducción

La dormición impuesta por el pericarpio es, por persistencia, más problemática que la dormición embrionaria para la producción del cultivo de girasol. Sin embargo, el conocimiento actual acerca de los determinantes de este tipo de dormición es aún escaso (Bodrone et al., 2017). Esto conlleva a que no existan metodologías que permitan eliminarla a escala industrial.

En el cultivo de girasol, la dormición impuesta por los tejidos que recubren al embrión puede implicar el establecimiento de hipoxia al embrión, posiblemente interfiriendo con el metabolismo del ácido abscísico (ABA) y aumentando su señalización. Esta hipótesis se basa en mecanismos descritos para cebada, cuyos granos tienen diferentes tejidos que recubren el embrión (i.e., endosperma, pericarpio, lema y pálea) (Benech-Arnold et al., 2006). Como en el caso del pericarpio de girasol, estos tejidos que recubren al embrión de cebada son ricos en polifenoles y actúan como “trampas” para el oxígeno, imponiendo hipoxia al embrión e interfiriendo con el metabolismo del ABA (incrementando la síntesis de esta hormona y/o reduciendo su catabolismo), y también interfiriendo con su señalización (incrementando la sensibilidad de los embriones al ABA) (Benech-Arnold et al., 2006; Mendiondo et al., 2010). Por lo tanto, mecanismos similares podrían estar operando en girasol en donde el pericarpio impone dormición en aquenios. Si esta suposición es correcta, el uso de agentes oxidantes para atenuar la hipoxia impuesta por el pericarpio aparece como una solución prometedora para mejorar la germinación, plausible de ser implementada a escala de industria semillera. El hipoclorito de sodio (NaClO) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), por ejemplo, son agentes oxidantes que eliminan la dormición en cariopses con glumas de sorgo de alepo (aplicado en su forma comercial pura y 0,9 M, respectivamente) (Benech-Arnold et al., 1992). El peróxido de hidrógeno aplicado a embriones aislados y granos intactos de cebada (99,9% en 30% v/v agua) también eliminó la dormición al reducir el nivel de ABA endógeno (Wang et al., 1998). A su vez, Liu et al. (2010) encontraron en *Arabidopsis* que el ABA y las giberelinas (GAs, hormona que actúa en la dormición de las semillas antagónicamente al ABA) están bajo la regulación del peróxido de hidrógeno en semillas dormidas, de manera tal que el peróxido de hidrógeno exógeno incrementa el catabolismo del ABA y la biosíntesis de GAs. Entender las bases fisiológicas de la dormición impuesta por el pericarpio resulta imperioso para diseñar tecnologías para su eliminación a escala industrial.

Este capítulo se llevó a cabo con una línea endocriada con dormición impuesta sólo por el pericarpio, cuya expresión fue evidente únicamente a altas temperaturas de incubación (i.e., 25°C y 30°C), para: i) evaluar el efecto del hipoclorito de sodio (agente oxidante) sobre la eliminación de la dormición, ii) explorar las bases fisiológicas a partir de las cuales el hipoclorito de sodio podría, eventualmente, terminar la dormición en aquenios incubados a altas temperaturas de incubación y, para ello, se evaluó la acumulación de ABA en el embrión durante la incubación a 30°C de aquenios con y sin uso del agente oxidante, iii) determinar el impacto del efecto del pericarpio sobre la emergencia del cultivo a campo (evaluado a través del comportamiento del aquenio a campo) y iv) evaluar la factibilidad del uso del hipoclorito de sodio para eliminar la dormición aplicado a escala de industria semillera, medido a través de la emergencia a campo.

## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. Material vegetal y terminología utilizada

Se utilizó la misma línea endocriada que la empleada en el Capítulo 2, que presentó dormición impuesta por el pericarpio, la cual se expresó sólo a altas temperaturas de incubación (i.e., 25°C-30°C) y no a bajas. Para todos los experimentos, a excepción del de aplicación de hipoclorito de sodio a escala industrial, se empleó el lote de aquenios del sitio de producción Luján de Cuyo (33°1'S, 68°52'O) en la provincia de Mendoza (Argentina) de la campaña 2009/2010 en la única fecha de siembra. Para el experimento a escala industrial, debido a la necesidad de contar con un gran volumen de aquenios y, a su vez, de un lote no dormido, se utilizaron aquenios producidos en el sitio Ascensión (34°13'S, 61°7'O) en la provincia de Buenos Aires en el año 2010 (lote con similar nivel de dormición) y otro del año 2012 (lote que no presentaba dormición).

En este capítulo: i) los términos aquenio, semilla y embrión se definen de la misma manera que en la Capítulo 2, ii) se utilizaron aquenios del tercio externo y medio del capítulo de girasol que se obtuvieron mediante el empleo de un tamiz de tajo (estos aquenios quedaron sobre el tamiz; mientras que los que se eliminaron fueron los que pasaron a través del tamiz que tuvieron un tamaño menor a 2,75 mm), iii) las temperaturas de incubación de 12°C-15°C (i.e., bajas temperaturas) y 25°C-35°C (i.e., altas temperaturas) fueron experimentadas para nuevamente permitir que la dormición impuesta por el pericarpio se exprese diferencialmente (Bodrone et al., 2017), iv) se consideró que un aquenio o semilla había germinado cuando la elongación de la radícula alcanzó los 2-3 mm, v) se consideró emergencia en el campo cuando los cotiledones fueron visibles por sobre la superficie del suelo (Karam et al., 2007).

### 3.2.2. Tratamiento de hipoclorito de sodio sobre aquenios, aplicado en condiciones de laboratorio

Se utilizó hipoclorito de sodio como agente oxidante para incrementar la disponibilidad de oxígeno al embrión en aquenios con dormición impuesta por el pericarpio (Benech-Arnold et al., 1992). Para ello, se sumergieron aquenios de la línea endocriada durante 2 min en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (concentración comercial 55 g Cl I<sup>-</sup>, Ayudín, Clorox Argentina S.A., Argentina) y se secaron con papel, previo a la incubación (i.e., aquenios tratados). Los aquenios no tratados (i.e., control) y los aquenios tratados fueron incubados a 12°C, 25°C y 30°C. La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada, con cuatro réplicas de 25 aquenios. El porcentaje de germinación se registró diariamente durante 20 d.

### 3.2.3. Contenido embrionario de ABA en aquenios no tratados y tratados con hipoclorito de sodio, aplicado en condiciones de laboratorio

El contenido embrionario de ABA fue medido en la línea endocriada en aquenios no tratados y tratados con hipoclorito de sodio (0,5%, 2 min) aplicado en condiciones de laboratorio, incubados a 30°C. Para el tratamiento con hipoclorito de sodio se utilizó el mismo protocolo que el del apartado anterior (3.2.2). La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada, con tres réplicas de 25 aquenios o semillas.

Para la determinación de ABA, se tomaron muestras de quince aquenios de cada tratamiento a diferentes tiempos de incubación antes de la germinación del primer aquenio. Posteriormente, estos aquenios fueron diseccionados para obtener embriones, congelados en nitrógeno líquido, y almacenados a -80°C hasta ser liofilizados. Luego

cada muestra fue liofilizada, molida con un mortero, pesada y almacenada a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta realizarse la determinación del contenido embrionario de ABA. Para la determinación, a cada muestra se le agregó agua destilada (100:1 v/p) y se la dejó durante toda la noche sobre un agitador a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después, cada muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 4 min y se analizaron 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante por muestra *in duplo* con un radioinmunoensayo como se describe en Steinbach et al. (1995) usando un anticuerpo mono-clonal AFR MAC 252 (Quarrie et al., 1988), y ABA tritiado (Amersham Biosciences, Reino Unido). Se calculó la media y el error estándar de la media de tres réplicas, cada una evaluada *in duplo*.

Paralelamente a este experimento del cual se tomaron muestras para la medición del contenido embrionario de ABA, se realizó otro experimento para medir el porcentaje de germinación de aquenios de cada tratamiento. De esta manera, se aseguró que la medición de ABA se llevara a cabo antes de que comience la germinación y también permitió relacionar el porcentaje de germinación con el contenido de ABA. Tres réplicas de cada tratamiento fueron incubadas (como en el caso del ensayo de medición de ABA) y se registró la germinación diariamente durante 20 d.

### **3.2.4. Tratamiento de hipoclorito de sodio sobre aquenios, aplicado a escala industrial**

Doce tratamientos (tratamientos 1-12, Cuadro 3. 1) fueron llevados a cabo a escala industrial, en instalaciones de la empresa Dow AgroSciences (Ruta 8, km 264, CP 2720, Colón, Buenos Aires, Argentina), para investigar si el tratamiento de hipoclorito de sodio aplicado a escala industrial logra eliminar la dormición impuesta por el pericarpio en aquenios de girasol. La empresa habitualmente aplica a los aquenios, mediante un equipo para tratamiento de semillas, dos químicos comerciales: uno previo al almacenaje de los aquenios en el silo (i.e., 1° químico) y el otro previo a la siembra (i.e., 2° químico). El 1° químico es un insecticida líquido (Reldan Plus,  $2 \times 10^{-5}$  l kg de aquenios<sup>-1</sup>, Dow AgroSciences, Argentina). El 2° químico es una mezcla líquida que contiene agua ( $2 \times 10^{-3}$  l kg de aquenios<sup>-1</sup>), un fungicida (Apron Gold,  $3 \times 10^{-3}$  l kg de aquenios<sup>-1</sup>, Syngenta Production France S.A.S., Francia), un polímero (Secure,  $7 \times 10^{-4}$  l kg de aquenios<sup>-1</sup>), un colorante (Blue Solid,  $3 \times 10^{-3}$  l kg de aquenios<sup>-1</sup>), y un insecticida (Cruiser 60 FS semillero,  $6 \times 10^{-3}$  l kg de aquenios<sup>-1</sup>, Syngenta Crop Protection Inc., Estados Unidos). Los tratamientos diseñados con hipoclorito de sodio consistieron en diferentes concentraciones del agente oxidante, métodos de aplicación y orden de aplicación dentro de la habitual secuencia de aplicación de la empresa, utilizando 2 kg de aquenios por tratamiento. Para los tratamientos 1-11 se usó la línea endocriada que se utilizó para los experimentos antes mencionados, pero perteneciente al sitio de producción Ascensión en la provincia de Buenos Aires (Argentina) de la campaña 2009/2010, con similar nivel de dormición (aclaración: no se usó el sitio Luján de Cuyo de la campaña 2009/2010 porque la empresa no contaba con el volumen necesario de ese lote para llevar a cabo este experimento). Para el tratamiento 12 se usó la línea endocriada que se utilizó para los experimentos antes mencionados, pero perteneciente al sitio de producción Ascensión de la campaña 2011/2012, que no presentaba dormición (i.e., control no dormido). El contenido de humedad fue medido después de cada aplicación y los aquenios fueron secados cuando fue necesario.

**Cuadro 3. 1.** Tratamientos aplicados a escala industrial sobre aquenios de la línea endocriada. Tratamientos 1-11 fueron aplicados a aquenios dormidos; el tratamiento 12 fue aplicado al control no dormido. El 1° químico fue un insecticida líquido (Reldan Plus,  $2 \times 10^{-5}$  1 kg de aquenios<sup>-1</sup>, Dow AgroSciences, Argentina) que Dow AgroSciences aplica a los aquenios previo al almacenaje en el silo. El 2° químico fue una mezcla líquida que Dow AgroSciences aplica a los aquenios previo a la siembra que contiene agua ( $2 \times 10^{-3}$  1 kg de aquenios<sup>-1</sup>), un fungicida (Apron Gold,  $3 \times 10^{-3}$  1 kg de aquenios<sup>-1</sup>, Syngenta Production France S.A.S., Francia), un polímero (Secure,  $7 \times 10^{-4}$  1 kg de aquenios<sup>-1</sup>), un colorante (Blue Solid,  $3 \times 10^{-3}$  1 kg de aquenios<sup>-1</sup>), y un insecticida (Cruiser 60 FS semillero,  $6 \times 10^{-3}$  1 kg de aquenios<sup>-1</sup>, Syngenta Crop Protection Inc., Estados Unidos).

Tratamiento	Secuencia de aplicaciones
1	1° químico
2	2° químico
3	1° químico-lavado al 1% de hipoclorito de sodio-secado-2° químico
4	1° químico-lavado al 3% de hipoclorito de sodio-secado-2° químico
5	1° químico-lavado al 7% de hipoclorito de sodio-secado-2° químico-secado
6	1° químico-2° químico junto con 3% de hipoclorito de sodio
7	1° químico-2° químico junto con 7% de hipoclorito de sodio-secado
8	1° químico-2° químico-lavado al 3% de hipoclorito de sodio-secado
9	1° químico-2° químico-lavado al 7% de hipoclorito de sodio-secado
10	1° químico 2° químico-asperjado al 3% de hipoclorito de sodio-secado
11	1° químico-2° químico-asperjado al 7% de hipoclorito de sodio-secado
12	1° químico

#### 3.2.4.1. Germinación en laboratorio

A los aquenios correspondientes a los doce tratamientos llevados a cabo a escala industrial (Cuadro 3. 1) se les evaluó la germinación en condiciones de laboratorio al cabo de 20 d de incubación a 12°C, 25°C y 30°C. La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada, con tres réplicas de 25 aquenios.

#### 3.2.4.2. Emergencia a campo

La efectividad de los tratamientos aplicados se midió a través del comportamiento de los aquenios correspondientes a los doce tratamientos llevados a cabo a escala industrial (Cuadro 3. 1) sembrados en el campo, simulando condiciones de producción. Para ello, los aquenios fueron sembrados a mano a una profundidad de 3 cm en los campos experimentales de: Facultad de Agronomía (Experimento 1, Exp. 1) (Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; 34°25'S, 58°25'O) el 13 de diciembre de 2012 y Dow AgroSciences (Experimento 2, Exp. 2) (Ferré, Buenos Aires, Argentina; 34°7'S, 61°7'O) el 26 de diciembre de 2012. En ambos experimentos, los tratamientos fueron distribuidos en un diseño en bloques completamente aleatorizados con tres réplicas debido a la heterogeneidad del suelo. Dentro de cada bloque, los aquenios de los doce tratamientos fueron sembrados en parcelas de dos surcos de 2,5 m de largo, con 50 aquenios por surco y con una distancia entre surcos de 20 cm. Las parcelas fueron regadas para permitir una adecuada germinación y posterior emergencia. Para el Exp. 1 la emergencia fue registrada diariamente durante 20 d y para el Exp. 2 la emergencia final fue determinada 20 d después de la siembra. La temperatura del suelo fue

registrada cada 30 min con un termómetro enterrado a la profundidad de siembra que, a su vez, estuvo acoplado con un registrador de datos.

### 3.2.4.3. Germinación en laboratorio, simulando condiciones de campo

A los aquenios correspondientes a los doce tratamientos llevados a cabo a escala industrial (Cuadro 3. 1) se les realizó un lavado por 15 min con agua destilada antes de su incubación en condiciones de laboratorio. Esto fue hecho para evaluar si una eventual mejora de la germinación de estos aquenios en el campo podría deberse al lixiviado de inhibidores de la germinación por efecto del riego y de las lluvias. A su vez, los aquenios lavados y no lavados con agua destilada fueron incubados a una temperatura de 25°C (constante) y a temperaturas alternadas de 15°C durante 12 h y 35°C durante 12 h, para emular el ambiente térmico experimentado por los aquenios a campo. La incubación se llevó a cabo en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada, con tres réplicas de 25 aquenios. El porcentaje de germinación se registró después de 20 d de incubación.

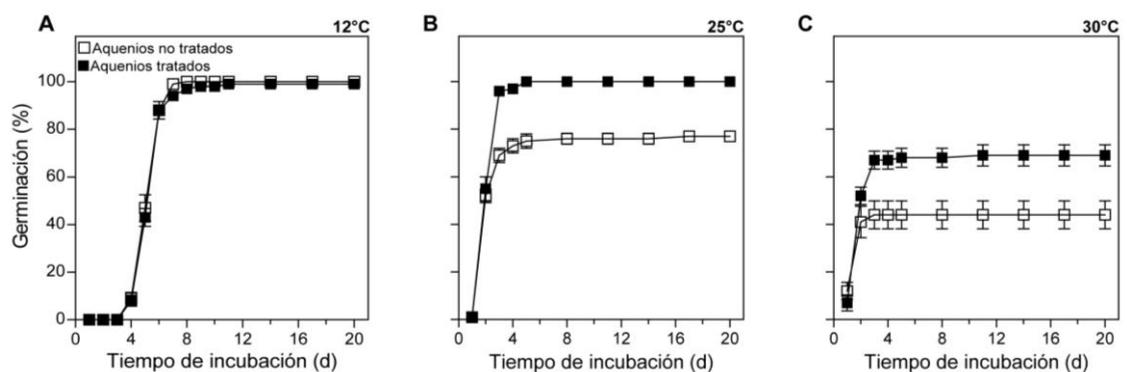
### 3.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (i.e., ANOVA), test de Tukey y matriz de correlación (con  $P \leq 0,05$ ) utilizando el programa InfoStat 2014 (Di Rienzo et al., 2014). Para las figuras se usó GraphPad Prism 4.0 (Motulsky, 2003).

## 3.3. Resultados

### 3.3.1. Tratamiento de hipoclorito de sodio sobre aquenios, aplicado en condiciones de laboratorio

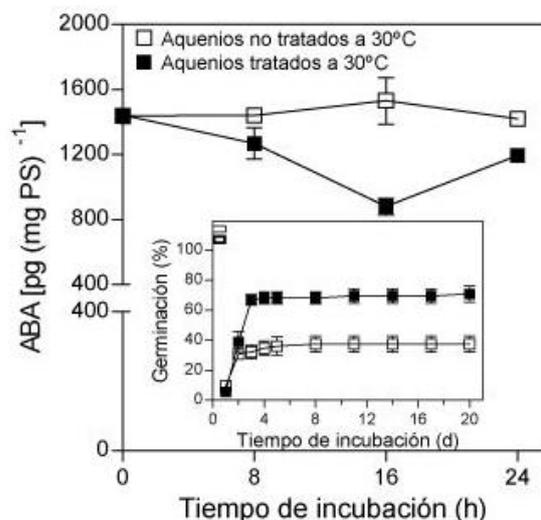
La germinación de aquenios tratados con hipoclorito de sodio (0,5%, 2 min) se incrementó significativamente en 23% y 25% cuando la incubación fue llevada a cabo a 25°C y 30°C, respectivamente, en comparación con aquenios no tratados (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Figura 3. 1B y C). Estos resultados sugieren que la dormición impuesta por el pericarpio podría ser eliminada, al menos parcialmente, con un adecuado acondicionamiento de los aquenios con hipoclorito de sodio.



**Figura 3. 1.** Germinación (%) de aquenios no tratados y tratados con hipoclorito de sodio (0,5%, 2 min, aplicado en condiciones de laboratorio) incubados en agua destilada a 12°C (A), 25°C (B) y 30°C (C). Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### 3.3.2. Contenido embrionario de ABA en aquenios no tratados y tratados con hipoclorito de sodio, aplicado en condiciones de laboratorio

La promoción de la germinación a 30°C en aquenios tratados con hipoclorito de sodio aplicado en condiciones de laboratorio (figura interna de la Figura 3. 2) fue acompañado por una disminución significativa en el contenido embrionario de ABA de estos aquenios observado a las 16 h después de comenzada la incubación (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Figura 3. 2) y unas pocas horas antes de la germinación del primer aquenio. Esto sugiere que el efecto estimulante del hipoclorito de sodio sobre la germinación de aquenios que expresan dormición a alta temperatura de incubación podría estar asociado a alteraciones en el contenido de ABA, como resultado de una posible interferencia del agente oxidante con la síntesis y/o el catabolismo de ABA durante la imbibición y antes de la germinación.



**Figura 3. 2.** Contenido embrionario de ABA durante la incubación en agua destilada de aquenios no tratados y tratados con hipoclorito de sodio (0,5%, 2 min, aplicado en condiciones de laboratorio) incubados a 30°C. Las barras representan el error estándar de la media para tres réplicas, cada una medida *in duplo*. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. La figura interna muestra la germinación (%) en agua destilada; sus barras representan el error estándar de la media para tres réplicas; y sus barras horizontales indican el período de muestreo para el contenido embrionario de ABA.

### 3.3.3. Tratamiento de hipoclorito de sodio sobre aquenios, aplicado a escala industrial

#### 3.3.3.1. Germinación en laboratorio

Al evaluar, en condiciones de laboratorio, los aquenios correspondientes a los doce tratamientos llevados a cabo a escala industrial (Cuadro 3. 1) se observó que la mayoría de los tratamientos resultaron en altos porcentajes de germinación cuando la incubación fue a 12°C (Cuadro 3. 2). Sin embargo, en la incubación a 25°C y 30°C la dormición fue expresada diferencialmente dependiendo del tratamiento y de la temperatura de incubación. La germinación fue baja en los tratamientos 1 y 2 (i.e., aquenios no tratados, controles dormidos) a 25°C y 30°C. En general, los tratamientos que incluyeron el lavado con hipoclorito de sodio al 3% y 7% (i.e., tratamientos 4, 5, 8, y 9) promovieron la germinación a 25°C y 30°C en comparación con los controles dormidos, pero la efectividad del hipoclorito de sodio aumentó cuando el oxidante fue aplicado después del 2° químico (i.e., tratamientos 8 y 9) (Cuadro 3. 2).

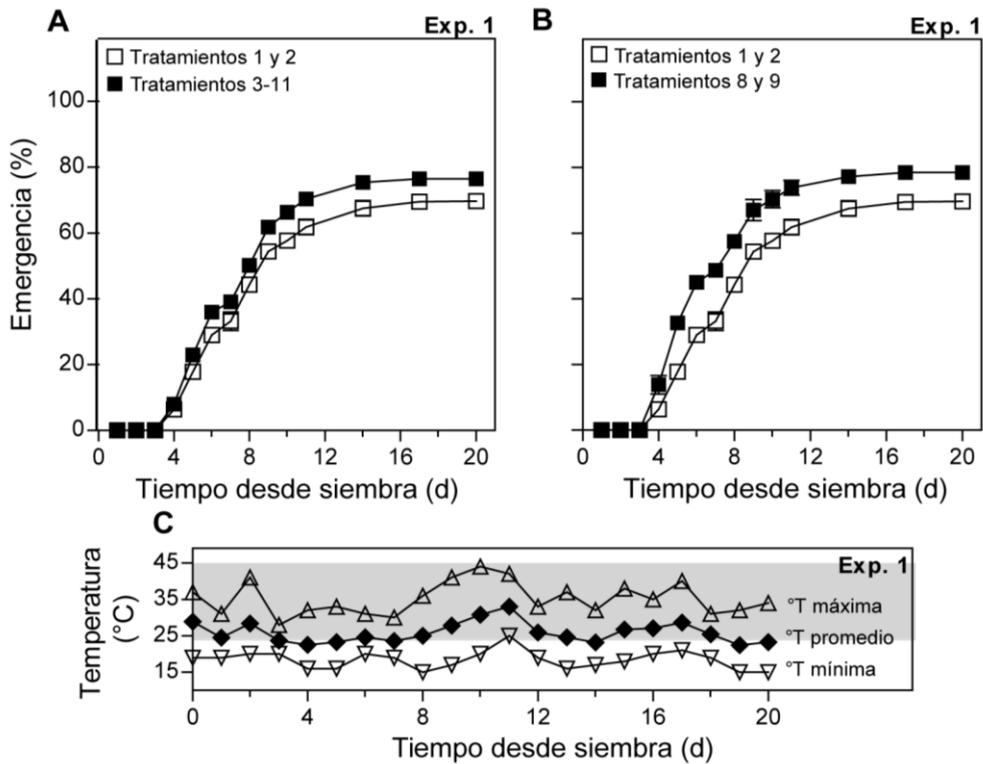
**Cuadro 3. 2.** Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada correspondientes a los tratamientos 1-12 después de 20 d de incubación a 12°C, 25°C y 30°C en agua destilada. Los tratamientos están descriptos en el Cuadro 3. 1. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para tres réplicas.

Tratamiento	Germinación (%) <sup>†</sup>		
	A 12°C	A 25°C	A 30°C
1	96,0 $\pm$ 2,3 ab	48,0 $\pm$ 4,0 cde	10,7 $\pm$ 1,3 ef
2	90,7 $\pm$ 2,7 abc	26,7 $\pm$ 5,3 de	2,7 $\pm$ 1,3 f
3	86,7 $\pm$ 2,7 abc	64,0 $\pm$ 2,3 bc	18,7 $\pm$ 3,5 def
4	92,0 $\pm$ 0,0 abc	52,0 $\pm$ 4,0 cd	28,0 $\pm$ 2,3 cde
5	96,0 $\pm$ 2,3 ab	65,3 $\pm$ 5,3 bc	38,7 $\pm$ 9,6 bcd
6	88,0 $\pm$ 2,3 abc	20,0 $\pm$ 8,3 e	2,7 $\pm$ 2,7 f
7	81,3 $\pm$ 4,8 bc	29,3 $\pm$ 9,3 de	10,7 $\pm$ 5,8 ef
8	97,3 $\pm$ 1,3 ab	82,7 $\pm$ 3,5 ab	49,3 $\pm$ 5,3 bc
9	98,7 $\pm$ 1,3 a	69,3 $\pm$ 5,8 abc	57,3 $\pm$ 2,7 ab
10	85,3 $\pm$ 6,7 abc	21,3 $\pm$ 5,3 e	6,7 $\pm$ 1,3 ef
11	78,7 $\pm$ 5,8 c	26,7 $\pm$ 5,3 de	2,7 $\pm$ 1,3 f
12	100,0 $\pm$ 0,0 a	94,7 $\pm$ 3,5 a	76,0 $\pm$ 4,6 a

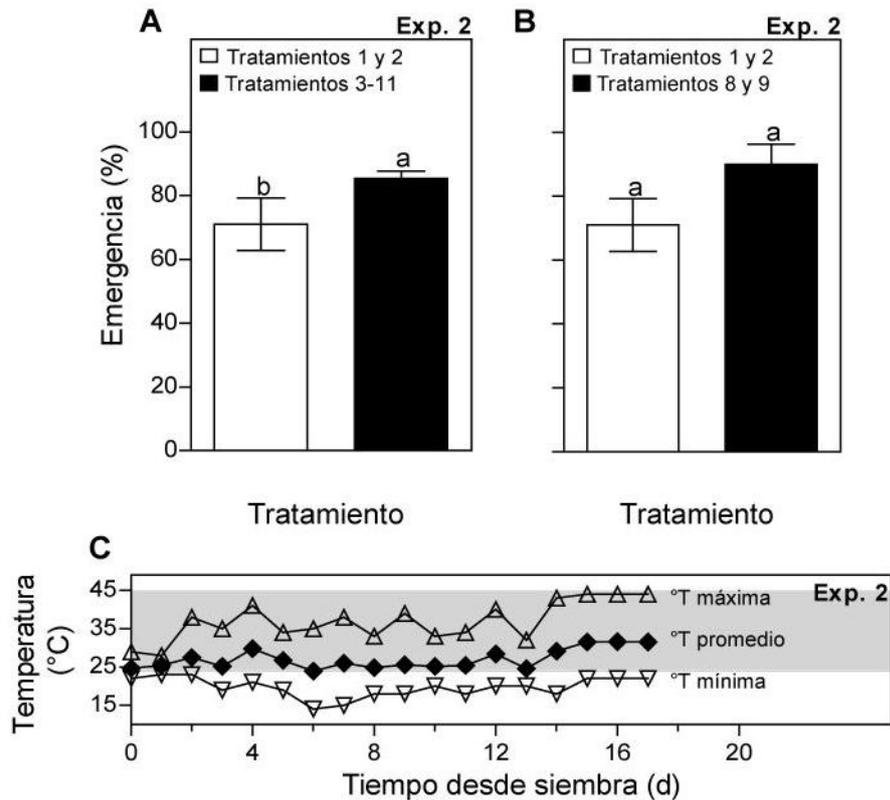
<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

### 3.3.3.2. Emergencia a campo

Los aquenios correspondientes a los doce tratamientos llevados a cabo a escala industrial (Cuadro 3. 1) fueron sembrados en el campo (Exp. 1 y 2) para evaluar si la mejora en germinación observada bajo condiciones de laboratorio (Cuadro 3. 2) también resultaba en mejoras en el comportamiento a campo. Los resultados de los tratamientos 3-11 (i.e., tratamientos que incluyeron la aplicación de hipoclorito de sodio) fueron agrupados y comparados contra los tratamientos 1 y 2 (i.e., controles no tratados) para cada experimento a campo, por separado, y se observó que los aquenios tratados con hipoclorito de sodio tuvieron un porcentaje de emergencia a campo significativamente mayor que los controles no tratados en el Exp. 1 y 2 (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Figura 3. 3A y Figura 3. 4A). A su vez, los resultados de los tratamientos 8 y 9 (i.e., lavados con hipoclorito de sodio al 3% y 7%, respectivamente) fueron agrupados y comparados contra los tratamientos 1 y 2 para cada experimento a campo, por separado, y se observó que en el Exp. 1 los aquenios de los tratamientos 8 y 9 tuvieron un porcentaje de emergencia a campo significativamente mayor que los controles no tratados (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Figura 3. 3B); sin embargo, en el Exp. 2, las diferencias no fueron significativas (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Figura 3. 4B), aunque hubo una tendencia a mayor germinación en aquenios de los tratamientos 8 y 9. Estos resultados indican que la dormición impuesta por el pericarpio en la línea endocriada puede ser eliminada con hipoclorito de sodio aplicado a escala industrial, con una mejora mesurable bajo condiciones de campo.



**Figura 3. 3.** Dinámica de la emergencia (%) para el Exp. 1: Tratamientos 1 y 2 y tratamientos 3-11 (A), tratamientos 1 y 2 y tratamientos 8 y 9 (B) y las temperaturas de suelo máximas, promedio y mínimas; el sombreado gris indica las temperaturas mayores a 25°C (C). Los tratamientos están descriptos en el Cuadro 3. 1. Las barras representan el error estándar de la media. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.



**Figura 3. 4.** Emergencia (%) después de 20 d desde la siembra para el Exp. 2: Tratamientos 1 y 2 y tratamientos 3-11 (A), tratamientos 1 y 2 y tratamientos 8 y 9 (B) y las temperaturas de suelo máximas, promedio y mínimas; el sombreado gris indica las temperaturas mayores a 25°C (C). Los tratamientos están descritos en el Cuadro 3. 1. Las barras representan el error estándar de la media. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el espesor de la línea. Letras diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

Aunque la emergencia a campo de los aquenios tratados con hipoclorito de sodio fue mayor que la de los aquenios no tratados, la diferencia entre tratamientos fue menor a la esperada basada en los experimentos en laboratorio realizados con anterioridad a los experimentos a campo (Figura 3. 3A y B; Figura 3. 4A y B y Cuadro 3. 2). Esto podría explicarse por el hecho de que las condiciones ambientales experimentadas por los aquenios en el campo son diferentes de aquellas en laboratorio. Los experimentos de laboratorio fueron llevados a cabo bajo temperaturas de incubación constantes mientras que, en el campo, una gran amplitud térmica fue observada (Figura 3. 3C y Figura 3. 4C). Además, la magnitud de la lixiviación de posibles inhibidores de la germinación podría haber sido diferente entre ambas condiciones experimentales (i.e., cajas de Petri versus campo).

### 3.3.3.3. Germinación en laboratorio, simulando condiciones de campo

Se evaluó el porcentaje de germinación de aquenios correspondientes a los doce tratamientos llevados a cabo a escala industrial (Cuadro 3. 1) en cuatro condiciones de incubación en laboratorio: aquenios no lavados y aquenios lavados con agua destilada durante 15 min previo a la incubación a 25°C (constante) y a temperaturas alternadas de 15°C durante 12 h y 35°C durante 12 h (Cuadro 3. 3). Una interacción significativa fue encontrada entre tratamientos y condición de incubación (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 3. 3). Se generó una matriz de correlación para relacionar los porcentajes de germinación bajo cada condición de incubación en laboratorio con la emergencia a

campo de los aquenios tratados industrialmente pertenecientes al Exp. 1. Ésta mostró que la emergencia a campo del Exp. 1 tuvo una correlación significativamente mayor con la condición de incubación de aquenios lavados incubados a 25°C ( $r=0,66$ ; matriz de correlación con  $P\leq 0,05$ ) y aquenios lavados incubados a temperaturas alternadas ( $r=0,66$ ; matriz de correlación con  $P\leq 0,05$ ) en comparación con los aquenios no lavados.

**Cuadro 3. 3.** Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada pertenecientes a los tratamientos 1-12 después de 20 d de incubación en agua destilada para cuatro condiciones de incubación: aquenios no lavados y aquenios lavados con agua destilada durante 15 min previo a la incubación en agua destilada a 25°C (constante) y a temperaturas alternadas (15°C durante 12 h y 35°C durante 12 h). Los tratamientos están descriptos en el Cuadro 3. 1. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para tres réplicas. Los resultados del ANOVA también son mostrados.

Tratamiento	Germinación (%)			
	Aquenios no lavados	Aquenios no lavados	Aquenios lavados	Aquenios lavados
	a 25°C	a 15/35°C	a 25°C	a 15/35°C
1	34,7 $\pm$ 2,7	78,7 $\pm$ 3,5	52,0 $\pm$ 4,6	74,7 $\pm$ 1,3
2	32,0 $\pm$ 2,3	38,7 $\pm$ 9,6	68,0 $\pm$ 0,0	58,7 $\pm$ 5,8
3	36,0 $\pm$ 4,0	54,7 $\pm$ 6,7	78,7 $\pm$ 1,3	80,0 $\pm$ 4,6
4	46,7 $\pm$ 1,3	64,0 $\pm$ 14,4	81,3 $\pm$ 3,5	86,7 $\pm$ 5,8
5	50,7 $\pm$ 3,5	66,7 $\pm$ 2,7	89,3 $\pm$ 4,8	88,0 $\pm$ 0,0
6	25,3 $\pm$ 11,9	36,0 $\pm$ 4,6	58,7 $\pm$ 5,8	61,3 $\pm$ 5,8
7	29,3 $\pm$ 4,8	40,0 $\pm$ 6,1	70,7 $\pm$ 4,8	60,0 $\pm$ 6,1
8	66,7 $\pm$ 12,7	84,0 $\pm$ 4,6	84,0 $\pm$ 4,0	80,0 $\pm$ 4,6
9	77,3 $\pm$ 2,7	70,7 $\pm$ 8,1	88,0 $\pm$ 4,6	84,0 $\pm$ 4,0
10	26,7 $\pm$ 8,1	48,0 $\pm$ 12,2	60,0 $\pm$ 4,6	61,3 $\pm$ 5,3
11	37,3 $\pm$ 11,9	36,0 $\pm$ 2,3	61,3 $\pm$ 1,3	57,3 $\pm$ 8,1
12	85,3 $\pm$ 2,7	97,3 $\pm$ 1,3	94,7 $\pm$ 3,5	98,7 $\pm$ 1,3
Efecto:	<i>P</i> :			
Tratamiento	$\leq 0,001$			
Condición de incubación	$\leq 0,001$			
Tratamiento x Condición de incubación	0,002			

### 3.4. Discusión

El mecanismo fisiológico responsable de la expresión de la dormición en aquenios de girasol a altas temperaturas de incubación es, hasta aquí, poco conocido y podría estar relacionado con la inducción de condición de hipoxia al embrión impuesta por el pericarpio (ver Capítulo 4). Es conocido que el hipoclorito de sodio, al descomponerse, libera oxígeno (Lister, 1956). Por ello, para intentar eliminar esta limitación de oxígeno al embrión se realizó, en condiciones de laboratorio, un tratamiento de lavado de aquenios con hipoclorito de sodio, un oxidante, que fue eficaz en terminar parte de la dormición expresada a altas temperaturas (Figura 3. 1B y C) ya sea reduciendo la hipoxia al embrión o el contenido de ABA, aunque la segunda posibilidad puede ser una consecuencia de la primera (Figura 3. 2). Resultados similares fueron obtenidos en cebada por Wang et al. (1998) al usar peróxido de hidrógeno como un oxidante en embriones aislados y granos intactos que también resultó en una reducción del nivel de

ABA endógeno. Como una explicación alternativa al efecto del hipoclorito de sodio podría argumentarse que es a través de un debilitamiento del pericarpio, como se evidenció que ocurre en semillas de lechuga termo-inhibidas (Drew y Brocklehurst, 1984).

Debido al éxito del tratamiento de hipoclorito de sodio en condiciones de laboratorio, y considerando que su implementación es mucho menos costosa que otros métodos probados para eliminar la dormición (i.e., etileno y giberelinas, ver Capítulo 2), es que se investigó el efecto del hipoclorito de sodio a escala industrial. Para ello, en instalaciones de la empresa se aplicó hipoclorito de sodio a tratamientos que consistieron en diferentes concentraciones del agente oxidante, métodos de aplicación y orden de aplicación dentro de la habitual secuencia de aplicación de la empresa (la cual consiste en un 1° químico aplicado a los aquenios previo al almacenaje en el silo y un 2° químico aplicado previo a la siembra) (Cuadro 3. 1). A los aquenios correspondientes a los doce tratamientos diseñados a escala industrial se les evaluó la germinación en condiciones de laboratorio (Cuadro 3. 2) y posteriormente, su emergencia en condiciones de campo (Figura 3. 3 y Figura 3. 4). Los experimentos conducidos en condiciones de laboratorio mostraron que, dentro de cada temperatura evaluada, los tratamientos que consistieron en lavado de aquenios con 3% y 7% de hipoclorito de sodio después de la aplicación del 2° químico (i.e., tratamientos 8 y 9, respectivamente) tuvieron mayor porcentaje de germinación en comparación con los otros tratamientos, particularmente a 30°C (Cuadro 3. 2). Por lo tanto, estos dos tratamientos fueron efectivos en contrarrestar la dormición impuesta por el pericarpio. Bajo condiciones de campo, estos dos tratamientos juntos tuvieron una emergencia 20% mayor que los controles no tratados (Figura 3. 3B y Figura 3. 4B). Además, los tratamientos 3-11 (i.e., tratamientos que incluyeron la aplicación de hipoclorito de sodio) tuvieron juntos una emergencia 15% mayor que los controles no tratados (Figura 3. 3A y Figura 3. 4A). Sin embargo, la mejora observada en la emergencia a campo fue mucho menor que la mejora medida previamente en condiciones de laboratorio entre aquenios tratados y no tratados incubados a altas temperaturas (Figura 3. 3A y B, Figura 3. 4A y B y Cuadro 3. 2). La menor diferencia entre los tratamientos en la condición de campo no se debió a un pobre comportamiento de los aquenios tratados, sino a un comportamiento superior al esperado de los aquenios no tratados. Las condiciones ambientales en el campo son diferentes de aquellas de laboratorio donde se realizaron los experimentos de germinación. Por esta razón, los aquenios tratados industrialmente fueron, a su vez, evaluados en laboratorio bajo condiciones de incubación que fueron diseñadas para imitar las posibles condiciones experimentadas por los aquenios en el campo, como son la lixiviación de inhibidores de la germinación por lluvia o riego y la fluctuación de temperaturas. Por consiguiente, los tratamientos incluyeron el lavado de aquenios con agua destilada durante 15 min previo a la incubación y la incubación a temperaturas alternadas (Cuadro 3. 3). Una fuerte correlación significativa fue encontrada entre la emergencia de los aquenios a campo del Exp.1 y la germinación de dos condiciones de incubación en laboratorio que fueron aquenios lavados e incubados a temperatura constante (25°C) y aquenios lavados e incubados a temperaturas alternadas (15°C durante 12 h y 35°C durante 12 h), lo que sugiere que en el campo las consecuencias de la dormición impuesta por el pericarpio podrían ser atenuadas debido a la prevalencia de fluctuación de un régimen térmico de suelo y lixiviación de inhibidores de la germinación.

La dormición impuesta por el pericarpio en girasol puede representar una limitación para el establecimiento del cultivo, aunque este capítulo permitió concluir que esta limitación en condiciones de campo es menor a la observada en condiciones de

laboratorio. Los resultados demostraron que este problema se puede superar, en gran parte, acondicionando a los aquenios con un agente oxidante como es el hipoclorito de sodio y que este acondicionamiento es posible realizarlo incluso a escala industrial, con mensurables beneficios a campo.

**CAPÍTULO 4**  
**La expresión de la dormición a altas**  
**temperaturas: Su relación con el aumento de la**  
**sensibilidad a la hipoxia y la actividad**  
**microbiana**



## CAPÍTULO 4

### **La expresión de la dormición a altas temperaturas: Su relación con el aumento de la sensibilidad a la hipoxia y la actividad microbiana**

#### **Resumen**

Se usaron dos genotipos de girasol que expresan dormición impuesta por el pericarpio a altas temperaturas de incubación (i.e., 30°C) para investigar el rol del pericarpio como una limitación de oxígeno al embrión (i.e., hipoxia), y su impacto sobre el contenido embrionario de ácido abscísico (ABA) y la sensibilidad a esta hormona. Los resultados mostraron que ambos genotipos tuvieron muy diferentes valores de umbral de oxígeno para inhibir la germinación de semillas cuando la incubación se llevó a cabo a 30°C. La expresión de la dormición en un genotipo se relacionó con una exacerbada sensibilidad embrionaria a la hipoxia mientras que, en el otro genotipo, el pericarpio pareció actuar como una severa restricción a la entrada de oxígeno. El incremento de la sensibilidad a la hipoxia estuvo, en parte, relacionado a un incremento de la sensibilidad al ABA, pero no hubo alteraciones en el metabolismo del ABA. La actividad de las comunidades microbianas en el pericarpio (bacterias y hongos) a altas temperaturas fue también evaluada como un determinante potencial de hipoxia al embrión. El consumo de oxígeno en pericarpios incubados a 30°C fue atenuado con antibióticos, lo que promovió en forma concomitante, la germinación de los aquenios. De acuerdo con la limitación de oxígeno severa observada en el embrión por parte del pericarpio, la carga microbiana en el pericarpio fue significativamente mayor en el híbrido comercial que en la línea endocriada; sin embargo la aplicación de antibióticos redujo fuertemente los recuentos de colonias bacterianas para cada genotipo. Diferentes comunidades bacterianas y fúngicas, evaluadas a través de sus perfiles de uso de fuentes carbonadas, se determinaron entre genotipos y después de la aplicación del tratamiento con antibióticos. Este capítulo pone en evidencia la relación entre el aumento de la sensibilidad a la hipoxia con la temperatura de incubación y la expresión de la dormición, y sugiere que la actividad microbiana podría ser parte del mecanismo a través del cual la hipoxia es impuesta.



#### 4.1. Introducción

Los tejidos que recubren al embrión pueden imponer dormición a través de la interferencia con el intercambio gaseoso (e.g., entrada de oxígeno y/o salida de dióxido de carbono) (Corbineau y Côme, 1995). Rolletschek et al. (2007) midieron la concentración de oxígeno en aquenios de girasol en desarrollo usando microsensores sensibles al oxígeno y reportaron valores marcadamente reducidos dentro del embrión en comparación con aquellos medidos en la región micropilar (i.e., 1  $\mu\text{M}$  versus 180  $\mu\text{M}$ ). Este impedimento al intercambio de gas, que da como resultado la restricción de oxígeno al embrión (i.e., hipoxia), puede, a su vez, interferir con el metabolismo de inhibidores de la germinación (Benech-Arnold et al., 2006). En efecto, es conocido que la actividad de la enzima ABA 8'-hidroxilasa está implicada en el catabolismo del ácido abscísico (ABA) (Cutler et al., 2000), y esta actividad es severamente reducida a concentraciones de oxígeno menores a 10% (Krochko et al., 1998). El lavado de aquenios de girasol con una solución de hipoclorito de sodio previo a la incubación (un tratamiento que atenúa la dormición) produjo una disminución en el contenido embrionario de ABA presumiblemente por incremento de los niveles de oxígeno y catabolismo del ABA en el embrión (ver Capítulo 3). A su vez, la condición de hipoxia puede incrementar la sensibilidad embrionaria al ABA como fue demostrado por Benech-Arnold et al. (2006) usando embriones de cebada.

La imposición de la hipoxia al embrión por el pericarpio podría ser a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, Lenoir et al. (1986) atribuyó el alto consumo de oxígeno por los granos enteros de cebada a la oxidación de compuestos fenólicos mediada por la alta actividad de la enzima polifenol oxidasa. La respiración de microorganismos presentes en la superficie del pericarpio (como en la superficie de cualquier otro fruto) también puede estar involucrada en la limitación de la difusión de oxígeno al embrión por competencia con este gas (Heydecker y Chetram, 1971).

El hecho de que la dormición impuesta por el pericarpio en aquenios es expresada a altas temperaturas de incubación pero no a bajas (i.e., menor a 20°C) podría ser explicado, entonces, a través de distintos mecanismos no excluyentes entre sí: i) la hipoxia es más intensa a altas temperaturas de incubación porque, además del aumento de la tasa respiratoria del embrión, el pericarpio retiene más oxígeno a altas temperaturas [i.e., mayor actividad de la polifenol oxidasa como ocurre en cebada (Lenoir et al., 1986), mayor respiración de microorganismos (Heydecker y Chetram, 1971) y/o una reducción en la solubilidad del oxígeno en fase acuosa (Hoang et al., 2013)], ii) esta baja disponibilidad de oxígeno favorece la acumulación de ABA a través del impedimento en el catabolismo de esta hormona (Benech-Arnold et al., 2006), iii) los embriones son más sensible a la hipoxia y/o al ABA a altas temperaturas de incubación (Benech-Arnold et al., 2006).

En este capítulo se exploraron las posibilidades arriba mencionadas utilizando la misma línea endocriada con dormición impuesta por el pericarpio de los Capítulos 2 y 3. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de oxígeno combinadas con diferentes temperaturas de incubación sobre: i) la germinación de aquenios y semillas; ii) el contenido embrionario de ABA durante el período de incubación; iii) la sensibilidad de las semillas al ABA. Las aproximaciones experimentales incluyeron el uso de una mezcla de antibióticos para investigar su efecto sobre la germinación de aquenios y sus comunidades microbianas evaluado a través del recuento de colonias bacterianas, los perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP, sigla en inglés de Carbon Level Physiological Profiles) e Índice de Diversidad de Shannon (Índice H) para bacterias y hongos. Los resultados tienen como objetivo generar un modelo fisiológico de funcionamiento de los aquenios de girasol con dormición impuesta por el pericarpio con

implicancias para el manejo de este problema a escala agronómica. A su vez, para evaluar hasta qué punto este modelo fisiológico puede ser generalizado a otros genotipos con dormición impuesta por el pericarpio, se incorporó al análisis aquenios de un híbrido comercial, a modo de comparación.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Material vegetal y terminología utilizada**

Se utilizó la misma línea endocriada que la empleada en el Capítulo 2, que presentó dormición impuesta por el pericarpio, la cual se expresó sólo a altas temperaturas de incubación (i.e., 25°C-30°C) y no a bajas. El lote de aquenios utilizado para los experimentos fue el del sitio de producción Luján de Cuyo (33°1'S, 68°52'O) en la provincia de Mendoza (Argentina), de la campaña 2009/2010, en la única fecha de siembra. Para complementar algunos experimentos, se utilizó un lote de aquenios perteneciente a un híbrido comercial de girasol (no nombrado debido a la confidencialidad con la industria semillera) con dormición impuesta por el pericarpio, cuya expresión fue evidente sólo a altas temperaturas de incubación. La dormición de este híbrido perjudica a la industria semillera porque la industria no puede vender como simiente a los productores un híbrido que presenta dormición. Cabe destacar que existen atributos morfo-fisiológicos de los aquenios de girasol (e.g., longitud y ancho de la semilla) que difieren entre la línea endocriada y el híbrido comercial y que podrían, eventualmente, regular la dormición.

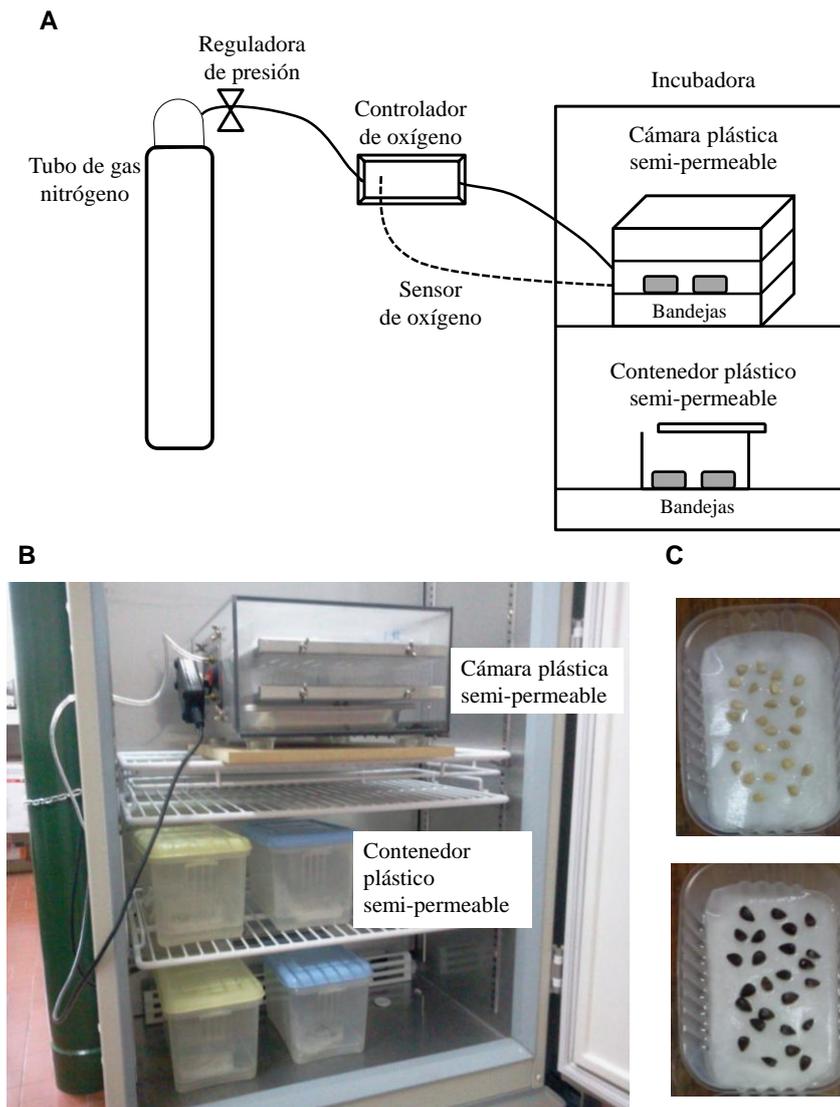
En este capítulo: i) los términos aquenio, semilla y embrión se definen de la misma manera que en el Capítulo 2, ii) se utilizaron aquenios del tercio externo y medio del capítulo de girasol que se obtuvieron mediante el empleo de un tamiz de tajo (estos aquenios quedaron sobre el tamiz; mientras que los que se eliminaron fueron los que pasaron a través del tamiz que tuvieron un tamaño menor a 2,75 mm), iii) las temperaturas de incubación de 10°C-12°C (i.e., bajas temperaturas) y 30°C (i.e., alta temperatura) fueron experimentadas para nuevamente permitir que la dormición impuesta por el pericarpio se exprese diferencialmente (Bodrone et al., 2017), iv) se consideró que un aquenio o semilla había germinado cuando la elongación de la radícula alcanzó los 2-3 mm.

### **4.2.2. Germinación de aquenios y semillas a diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas de incubación**

Aquenios y semillas de la línea endocriada y del híbrido comercial fueron incubados a concentraciones de oxígeno (O<sub>2</sub>) de 3, 5, 10, 15 y 21%, a 12 y 30°C. La incubación de semillas a concentraciones menores de 21% O<sub>2</sub> (i.e., hipoxia) se realizó para simular el efecto de la limitación de oxígeno impuesta al embrión por el pericarpio, mientras que la incubación de aquenios a concentraciones menores de 21% O<sub>2</sub> se llevó a cabo en un intento de generar una doble restricción a la disponibilidad de oxígeno. Veinticinco semillas o aquenios en cuatro réplicas fueron incubados para cada tratamiento (i.e., combinaciones de concentración de oxígeno y temperatura de incubación). Las semillas o aquenios fueron incubados en oscuridad en bandejas plásticas (9 cm de ancho x 6 cm de profundidad x 4 cm de alto) sobre un disco de papel de filtro con una capa de algodón debajo, humedecido con 55 ml de agua destilada.

La concentración de oxígeno por debajo de 21% fue modulada dentro de una cámara plástica transparente semi-permeable (35 cm de ancho x 30 cm de profundidad x 15 cm de alto, con agua en la base, Modelo C-274, BioSpherix, Estados Unidos) usando un controlador de oxígeno (PRO-OX Modelo 110, BioSpherix, Estados Unidos). Este

controlador tuvo una entrada de gas nitrógeno (el controlador fue conectado a un tubo de gas nitrógeno), una salida de gas nitrógeno (el controlador fue conectado a la cámara semi-permeable) y un sensor de oxígeno (este sensor fue colocado dentro de la cámara semi-permeable). Inicialmente, la concentración de oxígeno dentro de la cámara semi-permeable fue de 21% (i.e., la concentración de oxígeno en la atmósfera). Para alcanzar y mantener la concentración de oxígeno menor a 21% dentro de la cámara, el controlador de oxígeno registró la concentración de oxígeno dentro de la cámara (a través del sensor de oxígeno) y este controlador permitió que el gas nitrógeno ingresara a la cámara. Por lo tanto, la concentración de oxígeno seleccionada se alcanzó y se mantuvo por desplazamiento forzado del oxígeno (presente dentro de la cámara) con un flujo continuo de gas nitrógeno (i.e., a través de la dilución de oxígeno). Las bandejas de este tratamiento fueron colocadas dentro de la cámara semi-permeable. En contraste, la concentración de oxígeno de 21% (i.e., concentración de oxígeno en la atmósfera) se llevó a cabo en contenedores plásticos transparentes semi-permeables (21 cm de ancho x 13 cm de profundidad x 12 cm de alto, con agua en la base). Las bandejas de este tratamiento fueron colocadas dentro de los contenedores. Los contenedores y la cámara semi-permeable fueron colocados dentro de una incubadora con la temperatura seleccionada (12 o 30°C) (Figura 4. 1). La germinación fue medida al final del experimento (10 y 7 d a 12 y a 30°C, respectivamente).



**Figura 4. 1.** Diagrama teórico del sistema para lograr la incubación de semillas y aquenios a concentraciones atmosféricas menores a 21% O<sub>2</sub> dentro de la cámara plástica semi-permeable y a 21% O<sub>2</sub> (i.e., aire) en el contenedor plástico semi-permeable (A). Foto de cámara plástica semi-permeable y del contenedor plástico semi-permeable dentro de la incubadora (B). Foto de las bandejas con semillas y aquenios (C).

#### 4.2.3. Estructura del pericarpio por microscopía óptica

Aquenios de la línea endocriada y del híbrido comercial fueron cortados en la región central con una hoja de afeitar limpia para obtener finas rebanadas (aproximadamente 2 mm de espesor) e inmediatamente fueron fijadas en formaldehído-alcohol-acético por 48 h. Las rebanadas fueron deshidratadas en una serie de diluciones etanol-xilol y luego infiltradas y embebidas en parafina (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Posteriormente, el material fue cortado transversalmente y en serie (10-12  $\mu\text{m}$  de espesor) utilizando un micrótopo rotativo tipo Minot, las secciones fueron teñidas con safranina-fast green y montadas en bálsamo de Canadá (Johansen, 1940). Las variables medidas de la estructura del pericarpio fueron el número de capas de células del esclerénquima y el espesor del mismo ( $\mu\text{m}$ ) en seis aquenios por genotipo, con tres mediciones por aquenio. Para ello, las secciones fueron fotografiadas con un microscopio óptico Zeiss Axioplan (Oberkochen, Alemania) y analizadas con el software Zeiss AxioCam ERc 5s (Jena, Alemania).

#### **4.2.4. Contenido de ABA de semillas durante la incubación bajo diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas**

Veinticinco semillas de la línea endocriada fueron incubadas en oscuridad en bandejas plásticas (9 cm de ancho x 6 cm de profundidad x 4 cm de alto) sobre un disco de papel de filtro con una capa de algodón debajo, humedecido con 55 ml de agua destilada, a concentraciones de oxígeno de 5 y 21%, a 12 y 30°C. La concentración de oxígeno de 5% fue lograda con el mismo sistema descrito arriba. Diferentes períodos de muestreo fueron llevados a cabo para la determinación de ABA (cada 8 y 4 h desde el comienzo de la incubación a 12 y 30°C, respectivamente, hasta antes de la germinación de la primera semilla). Tres réplicas fueron incubadas por tratamiento y por período de muestreo. En cada período de muestreo, quince semillas por réplica (de las veinticinco semillas por réplica) por tratamiento fueron muestreadas al azar para la determinación de ABA. Luego del muestreo, estas semillas fueron diseccionadas en ejes embrionarios y cotiledones (con su correspondiente fracción de cubierta seminal y endosperma), congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta el procesamiento. Cada muestra fue luego liofilizada, molida, pesada y almacenada a -30°C hasta la cuantificación del contenido de ABA con un radioinmunoensayo, como fue descrito por Steinbach et al. (1995) usando un anticuerpo mono-clonal AFR MAC 252 (Quarrie et al., 1988) y ABA tritiado (Amersham Biosciences, Reino Unido).

Paralelamente a este experimento del cual se tomaron muestras para la medición del contenido de ABA, se realizó otro experimento para medir el porcentaje de germinación de semillas de cada tratamiento. De esta manera, se aseguró que la medición de ABA se llevara a cabo antes de que comience la germinación y también permitió relacionar el porcentaje de germinación con el contenido de ABA. Cuatro réplicas de cada tratamiento fueron incubadas (como en el caso del ensayo de medición de ABA) y se registró la germinación diariamente por 10 y 7 d a 12 y a 30°C, respectivamente.

#### **4.2.5. Sensibilidad al ABA en semillas incubadas bajo diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas**

Veinticinco semillas en cuatro réplicas de la línea endocriada fueron incubadas en oscuridad en bandejas plásticas (9 cm de ancho x 6 cm de profundidad x 4 cm de alto) sobre un disco de papel de filtro con una capa de algodón debajo, humedecido con 55 ml de agua destilada o soluciones de ABA. Se usaron concentraciones de ABA (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) de 0 (i.e., agua destilada), 1, 10, y 100  $\mu\text{M}$  ABA y la incubación fue llevada a cabo bajo concentraciones de oxígeno de 5 y 21% a 12 y 30°C. Para las soluciones de ABA, el componente se disolvió en 1 mol  $\text{l}^{-1}$  NaOH (hidróxido de sodio) de acuerdo con el protocolo <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/growth-regulators.html> provisto por Sigma-Aldrich. La concentración de oxígeno de 5% fue lograda con el mismo sistema descrito arriba. El porcentaje de germinación fue registrado al final del experimento (10 y 7 d a 12 y a 30°C, respectivamente).

#### **4.2.6. Medición del consumo de oxígeno durante la incubación de pericarpios aislados a diferentes temperaturas, en presencia y ausencia de antibióticos**

Trabajos previos han indicado que la superficie exterior del pericarpio está fuertemente colonizada por microorganismos, mientras que no se pudieron detectar bacterias en el embrión (Kutschera, 2002; Schauer y Kutschera, 2008). Este experimento tuvo como objetivo cuantificar el consumo de oxígeno durante la incubación de pericarpios aislados, como un estimador de la actividad de sus comunidades microbianas. Seis pericarpios aislados en cuatro réplicas de la línea endocriada fueron incubados en

oscuridad en viales de 4 cm<sup>3</sup> con 2 ml de agua destilada (control) o antibióticos (mezcla de fungicidas y bactericidas) a 10 y 30°C; seis pericarpios aislados en cuatro réplicas del híbrido comercial fueron además incubados a 30°C en ambos medios de incubación. La mezcla de antibióticos incluyó un fungicida comercial (0,75 µl/ml de Ritiram Carb Plus que contiene Thiram 35% y Carbendazim 15%) y tres bactericidas (gentamicina 0,1 mg/ml, ampicilina 0,4 mg/ml, y espectinomicina 0,2 mg/ml), y agua hasta alcanzar volumen. Estos antibióticos tienen diferentes modos de acción y su combinación se esperó que tuviese un efecto inhibitorio sobre la mayoría de hongos y bacterias. Para prevenir la difusión de oxígeno, los viales fueron cerrados con un tapón de goma con vaselina y el borde del vial se envolvió con parafilm. La concentración de oxígeno fue medida en el medio de incubación de cada vial al inicio de la incubación (0 h) y 24 h después, usando un microsensor de oxígeno (Unisense, Dinamarca) que es un sensor de oxígeno tipo Clark miniaturizado (i.e., un microsensor de oxígeno electroquímico). El consumo de oxígeno en el medio de incubación (para cada tratamiento) fue calculado como la diferencia entre la concentración de oxígeno al tiempo 0 y después de 24 h de incubación; luego este valor fue ajustado al volumen de los medios de incubación (2 ml) y se expresó como relativo al peso fresco de las muestras de pericarpio dentro de cada vial. La diferencia en el consumo de oxígeno entre la ausencia y presencia de antibióticos para cada genotipo y temperatura fue utilizada como un estimador de la actividad (i.e., respiración) de las comunidades microbianas en el pericarpio y su posible participación en la expresión de la dormición.

#### **4.2.7. Efecto del uso de antibióticos sobre la germinación del aquenio y sus comunidades microbianas a alta temperatura de incubación**

Para dilucidar si el aumento de la actividad microbiana estuvo relacionado con el impedimento de la germinación a alta temperatura de incubación, se evaluó el efecto de inhibir la proliferación microbiana sobre la germinación del aquenio. Cuatro réplicas de 25 aquenios de la línea endocriada y del híbrido comercial fueron incubadas en oscuridad en cajas de Petri de 9 cm sobre dos discos de papel de filtro humedecido con 6 ml de agua destilada o antibióticos (como está descrito arriba). El porcentaje de germinación final fue determinado después de 10 d de incubación.

En paralelo a este ensayo donde se midió germinación, se realizó otro ensayo con el mismo sistema experimental descrito arriba, pero con una incubación de 24 h a 30°C que fue llevado a cabo para estudiar las comunidades microbianas asociadas al aquenio a través del recuento de colonias bacterianas, los perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP, sigla en inglés de Carbon Level Physiological Profiles) e Índice de Diversidad de Shannon (Índice H) para bacterias y hongos. Estas aproximaciones experimentales buscaron proporcionar información sobre la carga bacteriana y diversidad de las comunidades microbianas presentes en los aquenios tratados con antibióticos y no tratados y relacionarlo con su respectiva germinación. Para los recuentos de colonias bacterianas, después de 24 h de incubación de tres réplicas, cinco aquenios por réplica fueron enjuagados en 1 ml de solución fisiológica estéril durante 5 min y se prepararon soluciones seriadas ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-5}$ ) utilizando más solución fisiológica estéril. Un volumen de 30 µl por cada dilución se colocó en medio LB-agar y se mantuvo a 30°C por 24 h hasta que las colonias fueron visibles. Además, para los CLPP e Índice H para bacterias y hongos, después de 24 h de incubación de cuatro réplicas, aquenios, filtros y medios de incubación (i.e., agua destilada o antibióticos) de cada réplica fueron transferidos a frascos de 200 ml con 50 ml de solución fisiológica (0,9% NaCl). Cada frasco fue agitado por 30 min y, posteriormente, se realizó la dilución  $10^{-1}$  para realizar los CLPP y el Índice H. Los perfiles de uso de fuentes carbonadas de comunidades

fúngicas y bacterianas se obtuvieron según lo descrito por Di Salvo y García de Salamone (2012). Las 23 fuentes carbonadas incluidas en las microplacas fueron: arginina, glutamina, glicina, fenilalanina, prolina, histidina, celobiosa, dextrosa, maltosa, ácido cumárico, xilosa, fructosa, glicerol, manitol, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido salicílico, ácido benzoico, Tween 20, putrescina y ácido itacónico. Para las microplacas bacterianas, 50  $\mu$ l por celda de violeta de tetrazolio (0,0025%) se incluyó como colorante indicador de redox, el cual inhibe el crecimiento fúngico, y no se agregaron antibióticos. Para las microplacas fúngicas, 50  $\mu$ l por celda de bactericidas, preparados como se describió arriba, fueron agregados y el colorante indicador de redox no se incluyó. Cada celda fue inoculada con 50  $\mu$ l de la dilución  $10^{-1}$ . Las microplacas fueron incubadas a 30°C por 96 h y cada una constó de cuatro muestras. Los valores de absorbancia fueron tomados a las 96 h con un lector de microplacas Multiskan EX™ (Labsystems, Finlandia) a 590 nm. Además, la diversidad funcional fue analizada usando el Índice de Diversidad de Shannon (Índice H), el cual fue obtenido de los valores de absorbancia de los CLPP de las microplacas (Di Salvo et al., 2018).

#### **4.2.8. Análisis estadístico**

Se realizaron análisis de varianza (i.e., ANOVA), test de Tukey, t-test y análisis discriminante (con  $P \leq 0,05$ ) utilizando el programa InfoStat 2014 (Di Rienzo et al., 2014). Para las figuras se usó GraphPad Prism 4.0 (Motulsky, 2003) e InfoStat 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Germinación de aquenios y semillas a diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas de incubación**

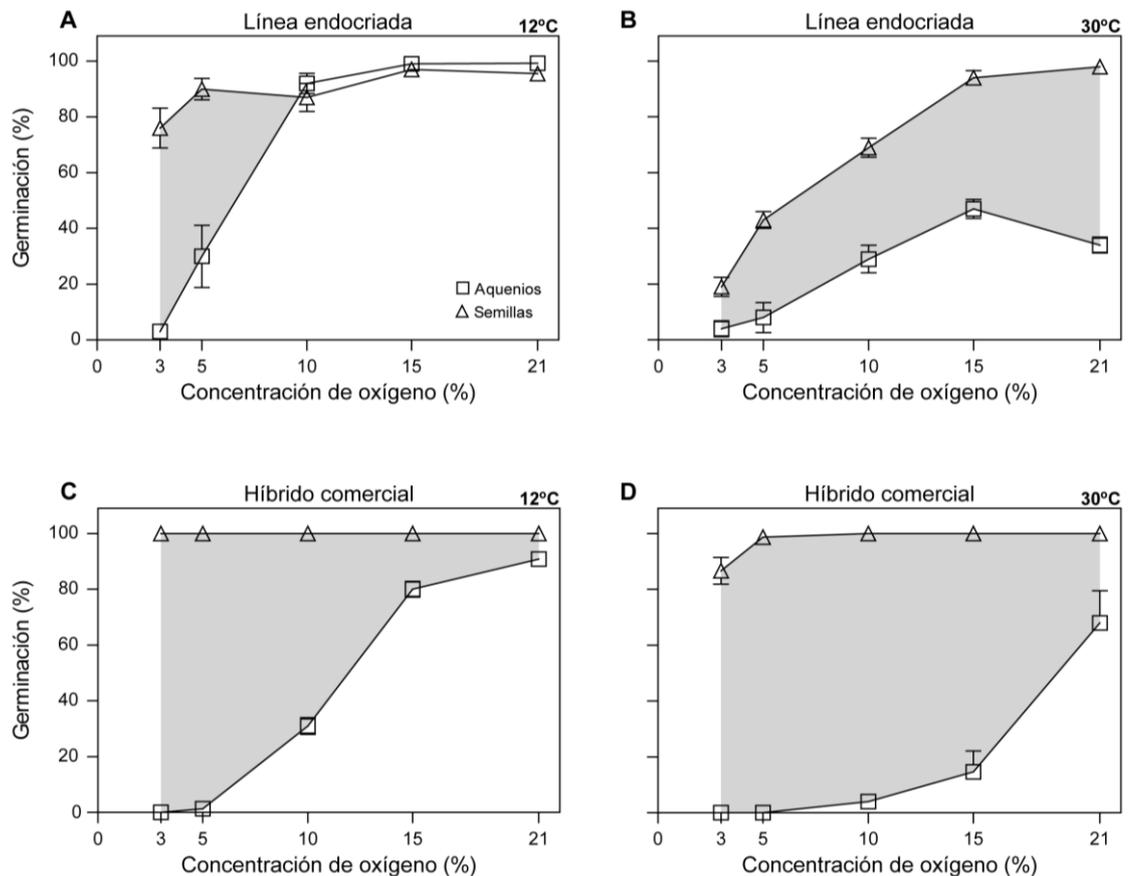
Los aquenios de la línea endocriada y del híbrido comercial alcanzaron casi el 100% de germinación en aire (i.e., 21% O<sub>2</sub>) a 12°C, pero la germinación cayó significativamente en ambos genotipos cuando la incubación se realizó a 30°C (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Figura 4. 2). Por el contrario, las semillas (i.e., aquenios sin pericarpio) de la línea endocriada y del híbrido comercial alcanzaron valores cercanos al 100% de germinación en aire tanto a baja como a alta temperatura de incubación (Figura 4. 2), lo que indica ausencia de dormición embrionaria en estos lotes de aquenios de estos genotipos en este estadio, y que la cubierta seminal y el endosperma no inhibieron la germinación. Por tanto, la incubación en aire demuestra que ambos genotipos presentaron dormición impuesta por el pericarpio y que su expresión fue evidente sólo a alta temperatura de incubación.

Cuando los aquenios fueron sometidos a concentraciones de oxígeno decrecientes, la germinación de ambos genotipos disminuyó con el incremento de la hipoxia, aunque los aquenios del híbrido comercial parecieron ser más sensibles a la hipoxia; esto fue independiente de la temperatura de incubación (Figura 4. 2). A su vez, en ambos genotipos, la disminución en la germinación de los aquenios bajo hipoxia fue mayor a 30°C que a 12°C (Figura 4. 2).

Cuando las semillas fueron incubadas bajo concentraciones de oxígeno decrecientes, los dos genotipos mostraron diferencias notables en su comportamiento. La germinación de semillas de la línea endocriada incubadas a concentraciones crecientes de hipoxia se mantuvo en valores elevados a 12°C (i.e., por encima del 76%) (Figura 4. 2A); sin embargo, la incubación a 3% O<sub>2</sub> casi completamente suprimió la germinación a 30°C, en semejanza con el comportamiento de aquenios incubados a la misma temperatura

pero en aire (Figura 4. 2B). Claramente, las semillas de la línea endocriada fueron muy sensibles a la hipoxia a 30°C pero mucho menos sensibles a 12°C. Por el contrario, la germinación de semillas del híbrido comercial incubadas bajo concentraciones crecientes de hipoxia permaneció alta tanto a 12 como a 30°C, incluso a 3% O<sub>2</sub> (Figura 4. 2C y D). Estos resultados confirman que, a diferencia de lo observado en semillas de la línea endocriada, las semillas del híbrido comercial tuvieron muy baja sensibilidad a la hipoxia a ambas temperaturas.

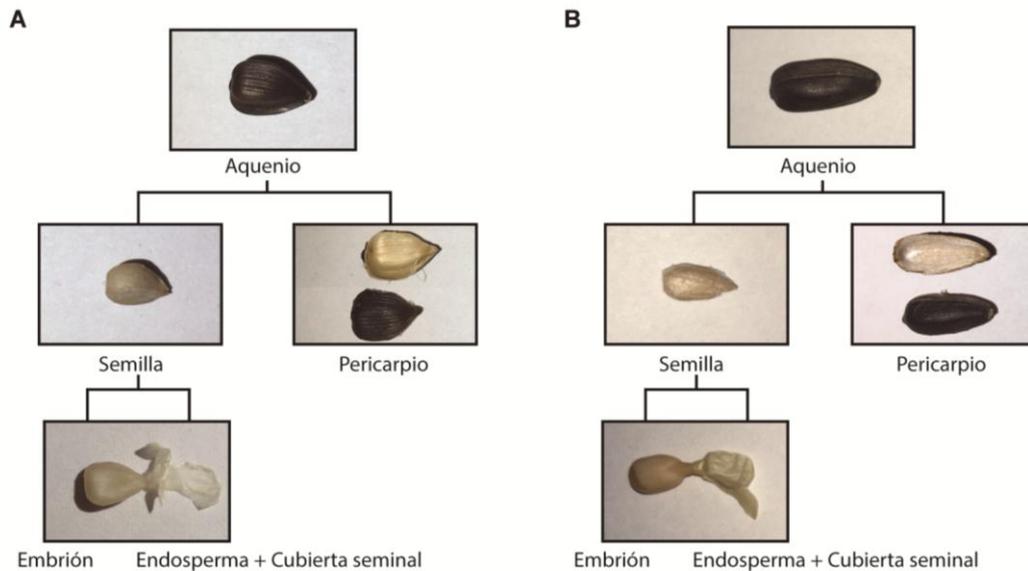
Tomados en conjunto, estos resultados muestran que estos genotipos poseen diferencias en su sensibilidad embrionaria a la hipoxia (evaluada como germinación de semillas, es decir, de aquenios sin pericarpio) especialmente a alta temperatura de incubación (i.e., 30°C). La sensibilidad embrionaria a la hipoxia cuando la incubación se realizó a 30°C explicó la dormición impuesta por el pericarpio expresada a 30°C en la línea endocriada (la germinación tanto de aquenios como de semillas disminuyó a una similar tasa con la hipoxia) pero no en el híbrido comercial (donde la disminución en la germinación de aquenios bajo hipoxia no fue acompañada por una similar disminución en la germinación de semillas). De hecho, como valores de oxígeno inferiores al 3% posiblemente fueron requeridos para inhibir la germinación de semillas en el híbrido comercial, se hizo evidente un efecto muy fuerte del pericarpio, como también se deduce de la alta sensibilidad de los aquenios a la hipoxia mostrada por este genotipo en comparación con la línea endocriada.



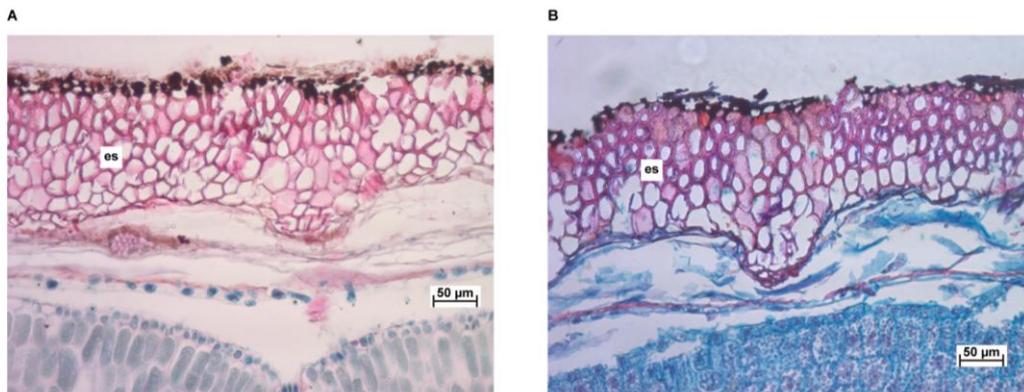
**Figura 4. 2.** Germinación (%) de aquenios y semillas después de 10 d de incubación a 12°C para la línea endocriada (A) y para el híbrido comercial (C) y después de 7 d de incubación a 30°C para la línea endocriada (B) y para el híbrido comercial (D) en agua destilada a diferentes concentraciones de oxígeno. Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo. El sombreado gris indica la diferencia en porcentaje medio de germinación entre la incubación sin pericarpio (i.e., semillas) y con pericarpio (i.e., aquenios) para el rango de concentraciones de oxígeno.

#### 4.3.2. Estructura del pericarpio por microscopía óptica

Para determinar si la alta sensibilidad de los aquenios del híbrido comercial a la hipoxia (en comparación con los aquenios de la línea endocriada) fue a través de la estructura del pericarpio (ver fotografías de los aquenios de ambos genotipos y sus componentes en Figura 4. 3), se evaluó el número de capas de células del esclerénquima y el espesor del mismo ( $\mu\text{m}$ ) en la línea endocriada (ver también Cuadro 2. 1 para la línea endocriada) y en el híbrido comercial (ver Figura 4. 4 para una evaluación visual de ambos genotipos). Ambas determinaciones fueron significativamente mayores en el híbrido comercial que en la línea endocriada (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 4. 1).



**Figura 4. 3.** Fotografías de un achenio de girasol de la línea endocriada (A) y del híbrido comercial (B) y sus componentes: semilla (embrión y endosperma + cubierta seminal) y pericarpio.



**Figura 4. 4.** Secciones transversales de la parte central de achenios de la línea endocriada (A) y del híbrido comercial (B). Abreviatura: es, esclerénquima. Barra de escala = 50 µm.

**Cuadro 4. 1.** Número de capas de células del esclerénquima y espesor del esclerénquima (µm) de achenios de la línea endocriada y del híbrido comercial. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para seis achenios por genotipo, con tres mediciones por achenio.

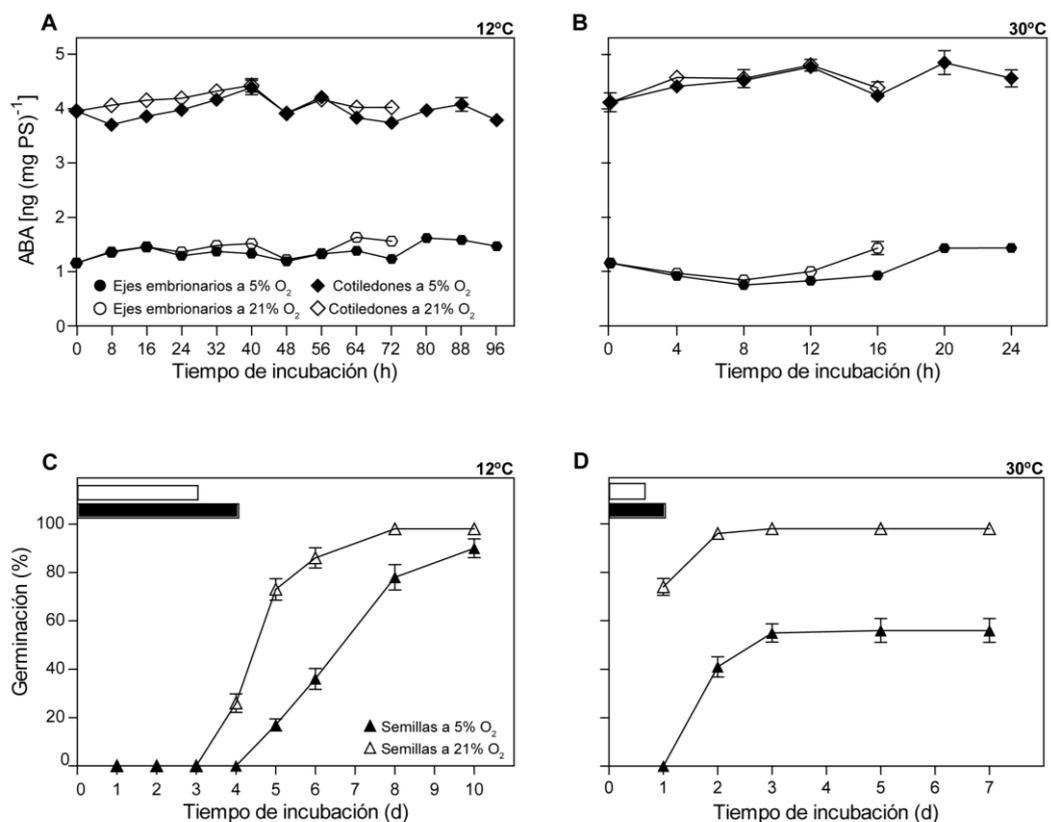
Genotipo	Número de capas de células del esclerénquima <sup>†</sup>	Espesor del esclerénquima (µm) <sup>†</sup>
Línea endocriada	7,0 $\pm$ 0,2 b	148,9 $\pm$ 3,6 b
Híbrido comercial	8,6 $\pm$ 0,4 a	189,3 $\pm$ 10,7 a

<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.3.3. Contenido de ABA de semillas durante la incubación bajo diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas

Como se vio en apartados más arriba, sólo la línea endocriada (y no el híbrido comercial) mostró alta sensibilidad embrionaria a la hipoxia a alta temperatura de incubación (evaluada como germinación de semillas, es decir, de achenios sin

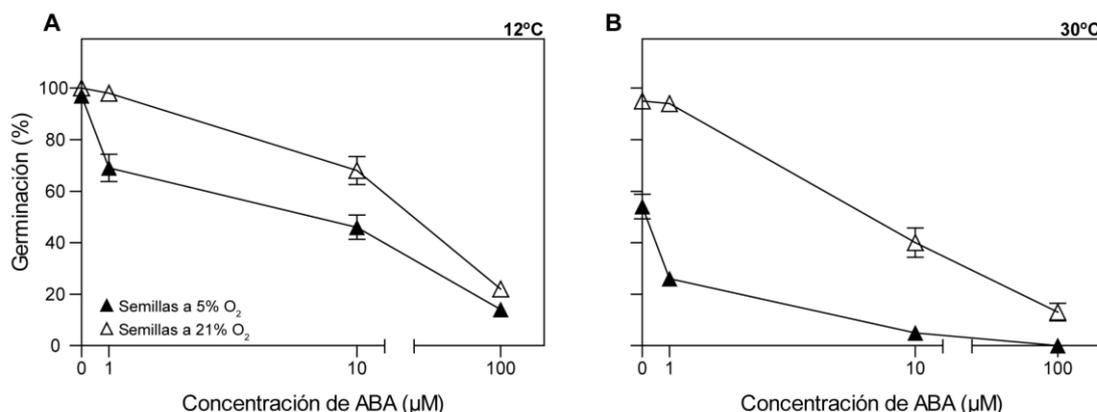
pericarpio). Por lo tanto, para evaluar si este aumento en la sensibilidad a la hipoxia fue a través de una interferencia con el catabolismo del ABA que debería resultar en la acumulación de esta hormona, se midió el contenido de ABA a lo largo del período de incubación y hasta antes de que la germinación ocurra. El contenido de ABA de semillas de la línea endocriada incubadas bajo hipoxia (i.e., 5% O<sub>2</sub>) y aire (i.e., 21% O<sub>2</sub>) fue medido en ejes embrionarios y cotiledones, por separado. El contenido de ABA en cotiledones fue 4 veces mayor que en ejes embrionarios y esta diferencia persistió durante la incubación tanto a 12 como a 30°C (Figura 4. 5A y B). Sin embargo, la hipoxia no produjo diferencias consistentes en el contenido de ABA en comparación con la incubación en aire tanto para cotiledones como para ejes embrionarios (Figura 4. 5A y B). A su vez, el contenido de ABA permaneció bastante estable durante la incubación a las dos temperaturas. La dinámica de germinación de semillas mostró diferencias entre las dos concentraciones de oxígeno tanto a 12 como a 30°C (Figura 4. 5C y D); sin embargo, el porcentaje de germinación final de semillas fue similar a 12°C (al décimo día) para las dos concentraciones de oxígeno pero fue menor para 5% O<sub>2</sub> a 30°C (al séptimo día) (Figura 4. 5C y D). Estos resultados muestran que la hipoxia no interfirió con el metabolismo del ABA en la línea endocriada y sugiere que la expresión de la dormición impuesta por el pericarpio a 30°C no es mediada por un incremento en el contenido de ABA.



**Figura 4. 5.** Contenido de ABA evaluado en ejes embrionarios y cotiledones a 5% O<sub>2</sub> y 21% O<sub>2</sub> durante la incubación de semillas de la línea endocriada en agua destilada a 12°C (A) y 30°C (B). Germinación (%) de semillas de la línea endocriada incubadas en agua destilada a 5 y 21% O<sub>2</sub> a 12°C (C) y 30°C (D); las barras horizontales indican el período de muestreo para el contenido de ABA a 5% O<sub>2</sub> (barra llena) y 21% O<sub>2</sub> (barra vacía). Las barras representan el error estándar de la media para tres réplicas, cada una medida *in duplo* (A y B) y para cuatro réplicas (C y D). Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.

#### 4.3.4. Sensibilidad al ABA en semillas incubadas bajo diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas

Para evaluar si el aumento en la sensibilidad embrionaria a la hipoxia exhibida por la línea endocriada a 30°C (como se vio en apartados más arriba) fue a través de un incremento en la sensibilidad embrionaria al ABA, se midió la germinación de semillas de esta línea endocriada incubadas bajo diferentes concentraciones de ABA, dos concentraciones de oxígeno (5 y 21%) y dos temperaturas (12 y 30°C). La germinación de semillas de la línea endocriada incubadas en presencia de diferentes concentraciones de ABA disminuyó con concentraciones crecientes de esta hormona tanto a 5 como a 21% O<sub>2</sub> (Figura 4. 6); la germinación en agua (i.e., 0 μM ABA) fue alta y similar para ambas concentraciones de oxígeno a 12°C, pero a 30°C la germinación de las semillas fue inhibida a 5% O<sub>2</sub> en relación al 21% O<sub>2</sub> (Figura 4. 6). A 12°C, fue necesario 100 μM ABA para casi suprimir completamente la germinación bajo hipoxia y aire; sin embargo, a 30°C, sólo 10 μM ABA fue suficiente para suprimir la germinación bajo hipoxia y 100 μM ABA para hacerlo en aire (Figura 4. 6). La incubación a 30°C incrementó la sensibilidad al ABA a 21% O<sub>2</sub> en comparación a 12°C; esto fue evidente cuando se compararon los valores de germinación a 10 μM ABA (Figura 4. 6B y A). Estos resultados muestran que la hipoxia incrementa la sensibilidad al ABA, así como la alta temperatura de incubación. Sin embargo, no fueron detectados efectos sinérgicos entre hipoxia y temperatura de incubación (i.e., la interacción no fue significativa, t-test con  $P \leq 0,05$ ).

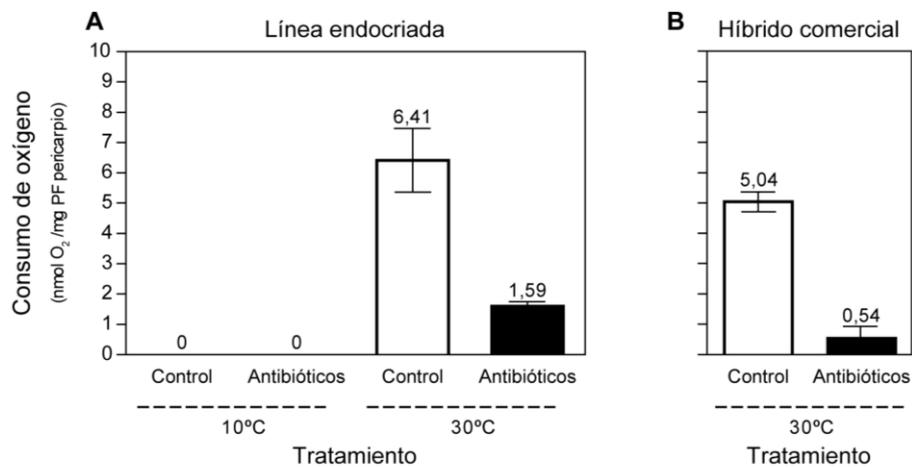


**Figura 4. 6.** Germinación (%) de semillas de la línea endocriada después de 10 d de incubación a 12°C (A) y 7 d a 30°C (B) en soluciones de ABA a concentraciones de 0 (i.e., agua destilada), 1, 10, y 100 μM ABA a 5 y 21% O<sub>2</sub>. Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.

#### 4.3.5. Medición del consumo de oxígeno a diferentes temperaturas de incubación, en presencia y ausencia de antibióticos

Los pericarpios aislados de la línea endocriada incubados a 10°C no mostraron consumo de oxígeno detectable ni en el control ni en el tratamiento con antibióticos (Figura 4. 7A), lo que sugiere que la actividad de las comunidades microbianas en el pericarpio fue insignificante a esta temperatura y, consecuentemente, no implica limitación en términos de disponibilidad de oxígeno para el embrión. En contraste, a 30°C el tratamiento control de ambos genotipos tuvo valores más altos de consumo de oxígeno que aquellos obtenidos con el tratamiento con antibióticos (Figura 4. 7), lo que sugiere que, a alta temperatura de incubación, la actividad microbiana fue alta y consumió oxígeno que no quedó disponible para el embrión. Esta posibilidad está fuertemente

apoyada por el hecho de que la aplicación del tratamiento con antibióticos redujo el consumo de oxígeno a un cuarto y a un noveno en pericarpios de la línea endocriada y del híbrido comercial, respectivamente (Figura 4. 7).



**Figura 4. 7.** Consumo de oxígeno (nmol O<sub>2</sub>/mg PF pericarpio) en el medio de incubación por pericarpios aislados de la línea endocriada a 10 y 30°C (A) y pericarpios aislados del híbrido comercial a 30°C (B) después de 24 h de incubación. Los medios de incubación fueron agua destilada (i.e., control) y antibióticos que consistió en un fungicida comercial (0,75 µl/ml de Ritiram Carb Plus que contiene Thiram 35% y Carbendazim 15%) y tres bactericidas (gentamicina 0,1 mg/ml, ampicilina 0,4 mg/ml, y espectinomicina 0,2 mg/ml), y agua hasta alcanzar el volumen final. Las barras representan el error estándar de la media para cuatro réplicas. Cuando las barras no se muestran, el valor del error estándar de la media es menor que el espesor de la línea.

#### 4.3.6. Efecto del uso de antibióticos sobre la germinación del aquenio y sus comunidades microbianas a alta temperatura de incubación

Para evaluar la posibilidad de que el consumo de oxígeno a alta temperatura de incubación debido a la actividad de las comunidades microbianas en la superficie del pericarpio es probable que desempeñe un papel en la dormición impuesta por el pericarpio, es que esta actividad fue inhibida usando antibióticos (mezcla de fungicidas y bactericidas). El efecto del tratamiento con antibióticos sobre la germinación de aquenios a 30°C fue diferente dependiendo del genotipo (Cuadro 4. 2). En la línea endocriada, el tratamiento con antibióticos incrementó la germinación pero no lo suficiente como para determinar una diferencia significativa en la germinación del aquenio en comparación con su control (i.e., agua destilada) (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 4. 2). Por el contrario, para el híbrido comercial, el tratamiento con antibióticos aumentó la germinación significativamente (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 4. 2).

**Cuadro 4. 2.** Germinación (%) de aquenios de la línea endocriada y del híbrido comercial después de 10 d de incubación a 30°C en agua destilada (i.e., control) y antibióticos. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para cuatro réplicas.

<b>Germinación (%)<sup>†</sup> a 30°C</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Línea endocriada</b>	<b>Híbrido comercial</b>
Control	57,0 $\pm$ 9,3 a	49,5 $\pm$ 4,7 b
Antibióticos	70,0 $\pm$ 2,6 a	74,0 $\pm$ 5,9 a

<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

El mismo sistema experimental, pero con una incubación de 24 h a 30°C, fue llevado a cabo para el recuento de colonias bacterianas y para estimar los CLPP e Índice H de comunidades bacterianas y fúngicas asociadas con los aquenios de los diferentes tratamientos. Las colonias bacterianas/cm<sup>2</sup> para la dilución de  $1 \times 10^{-4}$  difirieron significativamente entre el tratamiento control y el tratamiento con antibióticos para cada genotipo (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 4. 3). A su vez, la carga bacteriana fue significativamente mayor en el híbrido comercial que en la línea endocriada para la misma dilución (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 4. 3).

**Cuadro 4. 3.** Colonias bacterianas/cm<sup>2</sup> presentes en la dilución  $1 \times 10^{-4}$ , perteneciente al tratamiento control y tratamiento con antibióticos, para la línea endocriada y el híbrido comercial después de 24 h de incubación a 30°C. Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para tres réplicas.

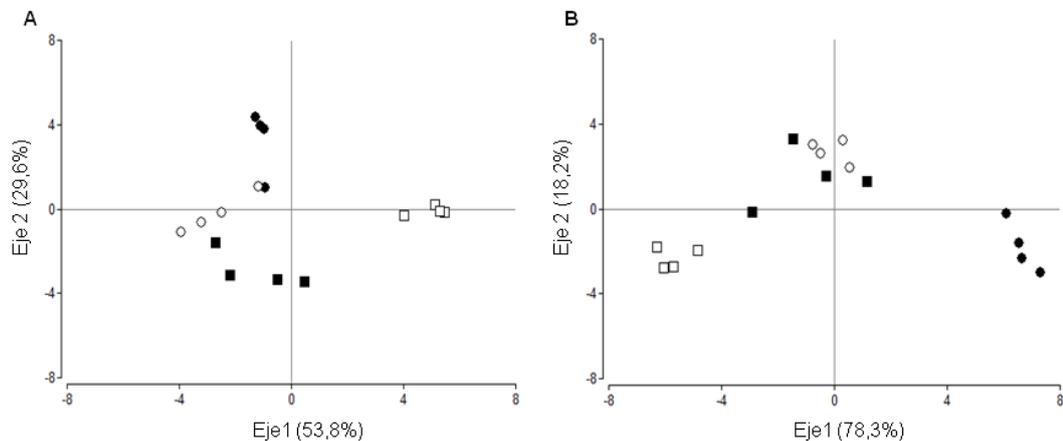
<b>Colonias bacterianas/cm<sup>2†</sup> a 30°C</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Línea endocriada</b>	<b>Híbrido comercial</b>
Control	3,0 $\pm$ 0,3 a	41,1 $\pm$ 6,2 a
Antibióticos	0,0 $\pm$ 0,0 b	0,0 $\pm$ 0,0 b

<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

Además, los CLPP fueron diferentes a 96 h de incubación para cada genotipo (Figura 4. 8). En el análisis discriminante de los perfiles de los CLPP de comunidades bacterianas, los ejes 1 y 2 explicaron el 83,4% del total de la variación (Figura 4. 8A). Las comunidades bacterianas agrupadas a la derecha del eje 1 usaron preferentemente celobiosa, histidina, putrescina, glicina, maltosa y glicerol como fuentes carbonadas, mientras que las comunidades bacterianas agrupadas a la izquierda usaron preferentemente fructosa, glutamina y dextrosa. Las comunidades bacterianas agrupadas en la parte inferior del eje 2 usaron preferentemente prolina como fuente carbonada. El análisis discriminante mostró que las comunidades bacterianas difirieron en gran medida entre ambos genotipos, principalmente a lo largo del eje 1 para el tratamiento control. Los antibióticos también tuvieron un profundo impacto en los perfiles de las comunidades bacterianas, el cual se pudo ver como un desplazamiento a lo largo del eje 1 para la línea endocriada y del eje 2 para el híbrido comercial. Además, el Índice H para comunidades bacterianas difirió significativamente entre aquenios control y aquenios tratados con antibióticos para el caso de la línea endocriada (test de Tukey con

$P \leq 0,05$ ; Cuadro 4. 4) pero no para el híbrido comercial (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 4. 4).

Con respecto al análisis discriminante de los CLPP de comunidades fúngicas, los ejes 1 y 2 explicaron el 96,5% del total de la variación (Figura 4. 8B). Las comunidades fúngicas agrupadas a la derecha del eje 1, usaron preferentemente histidina y maltosa como fuentes carbonadas, mientras que las comunidades fúngicas agrupadas a la izquierda usaron preferentemente ácido itacónico, ácido cítrico, glicerol y celobiosa. Las comunidades fúngicas agrupadas en la parte superior del eje 2 usaron preferentemente ácido láctico como fuente carbonada, mientras que las comunidades fúngicas agrupadas en la parte inferior usaron preferentemente glicina y glutamina. El análisis discriminante mostró que las comunidades fúngicas difirieron en gran medida entre genotipos, a lo largo tanto del eje 1 como del eje 2, cuando se compararon los tratamientos control. Además, para cada genotipo, las comunidades fúngicas fueron afectadas por el tratamiento con antibióticos, el cual produjo cambios a lo largo de ambos ejes (principalmente el eje 1). No se obtuvieron diferencias significativas en el Índice H para comunidades fúngicas para aqenios control y aqenios tratados con antibióticos para cada genotipo (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ; Cuadro 4. 4).



**Figura 4. 8.** Análisis discriminante de los perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP por sus siglas en inglés) de comunidades bacterianas (A) y fúngicas (B) en aqenios de dos genotipos, tratados y no tratados con antibióticos y evaluados en cuatro réplicas. Los cuadrados corresponden a la línea endocriada y los círculos al híbrido comercial; mientras que los símbolos blancos y negros indican el control y el tratamiento con antibióticos, respectivamente. Los datos usados para el análisis corresponden a los valores de absorbancia a las 96 h. La varianza total explicada por cada eje está mostrada ente paréntesis.

**Cuadro 4. 4.** Diversidad funcional de comunidades bacterianas y fúngicas analizadas usando el Índice H, el cual fue obtenido de los valores de absorbancia de los perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP por sus siglas en inglés) de las microplacas, para ambos genotipos (línea endocriada e híbrido comercial) y tratamientos (con y sin antibióticos). Los valores son las medias  $\pm$  el error estándar de la media para cuatro réplicas.

Tratamiento	Índice H de bacterias <sup>†</sup> a 30°C		Índice H de hongos <sup>†</sup> a 30°C	
	Línea endocriada	Híbrido comercial	Línea endocriada	Híbrido comercial
Control	2,59 $\pm$ 0,19 a	2,46 $\pm$ 0,09 a	2,58 $\pm$ 0,14 a	2,29 $\pm$ 0,13 a
Antibióticos	1,81 $\pm$ 0,19 b	2,44 $\pm$ 0,09 a	2,48 $\pm$ 0,14 a	2,64 $\pm$ 0,13 a

<sup>†</sup>Medias de los tratamientos dentro de cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes según test de Tukey (con  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.4. Discusión

Alcanzar una emergencia de plántulas rápida y uniforme es de suma importancia para el rendimiento de los cultivos (Paparella et al., 2015). Por esta razón, el mercado de semillas está intentando aumentar los estándares de calidad de las semillas (Paparella et al., 2015) con la prioridad de la eliminación de la dormición en las especies que aún la tienen. El presente capítulo ahondó en los mecanismos fisiológicos detrás de la dormición impuesta por el pericarpio en los aquenios de girasol y su expresión a altas temperaturas de incubación, basándose en el comportamiento de la línea endocriada (utilizada en los Capítulos 2 y 3). Adicionalmente, se incorporó un híbrido comercial que también presenta este tipo de dormición, a modo de comparación para evaluar hasta qué punto el modelo fisiológico derivado de la línea endocriada podría ser generalizado. El estudio se enfocó en el ambiente de imbibición (i.e., temperatura) y se consideró la disponibilidad de oxígeno al embrión (Gay et al., 1991), el contenido de ABA y la sensibilidad a esta hormona (Benech-Arnold et al., 2006), y la respiración de las comunidades microbianas en el pericarpio (Heydecker y Chetram, 1971) como características, no sólo mencionadas en la literatura como partícipes de estos mecanismos fisiológicos, sino también propuestas a partir de estudios previos realizados con la misma línea endocriada en los Capítulos 2 y 3.

La germinación de aquenios y semillas de ambos genotipos se evaluó bajo diferentes concentraciones de oxígeno y temperaturas. Los aquenios de ambos genotipos mostraron dormición impuesta por el pericarpio cuando se los incubó en aire (i.e., 21% O<sub>2</sub>), la cual se expresó solamente a alta temperatura de incubación (Figura 4. 2), como había sido reportado en los Capítulos 2 y 3 para la línea endocriada. En la incubación en aire, la eliminación del pericarpio permitió la germinación a 30°C en ambos genotipos (Figura 4. 2B y D). Sin embargo, cuando las semillas (i.e., aquenios sin pericarpio) fueron incubadas bajo hipoxia, la germinación de la línea endocriada disminuyó notablemente con el aumento de la hipoxia a 30°C hasta el punto de que la germinación de estas semillas a 3% O<sub>2</sub> fue similar a la de aquenios incubados a 30°C pero en aire (Figura 4. 2B). Por el contrario, las semillas del híbrido comercial mostraron una sensibilidad muy baja a la hipoxia a cualquier temperatura (Figura 4. 2C y D), con un valor de umbral de oxígeno para inhibir la germinación por debajo de 3% O<sub>2</sub>. En otras palabras, ambos genotipos mostraron similar dormición impuesta por el pericarpio expresada a alta temperatura de incubación pero, en la línea endocriada, esta expresión pareció deberse a una exacerbada sensibilidad embrionaria a la hipoxia mientras que, en el híbrido comercial, el pericarpio pareció actuar como una severa restricción cuando la incubación fue llevada a cabo a alta temperatura. Esto último está particularmente

apoyado por el hecho de que la germinación de aquenios del híbrido comercial en hipoxia fue más severamente inhibida que la germinación de aquenios de la línea endocriada (Figura 4. 2D y B). Curiosamente, el pericarpio puede desempeñar un papel diferente en la germinación del girasol: Andrade et al. (2015) observaron en una línea de girasol no dormida que la presencia del pericarpio puede aumentar la germinación debido a que proporciona protección estructural.

La sensibilidad a la hipoxia ha sido estudiada en semillas de otras especies. Por ejemplo, en melón, la sensibilidad de las semillas a la hipoxia se incrementa a bajas temperaturas de incubación, incluso cuando la solubilidad del oxígeno en fase acuosa y su disponibilidad al embrión se sabe que son mayores que a altas temperaturas (Edelstein et al., 1995). Los procesos fisiológicos detrás de la sensibilidad a la hipoxia a bajas temperaturas difieren entre genotipos de melón y son en su mayoría desconocidos (Edelstein y Welbaum, 2011) como lo son los mecanismos que operan diferencialmente entre la línea endocriada y el híbrido comercial.

Para evaluar si la alta sensibilidad a la hipoxia mostrada por aquenios del híbrido comercial a alta temperatura se debe a una restricción física severa ejercida por el pericarpio, se evaluó la estructura del pericarpio. El número de capas de células del esclerénquima y el espesor del mismo fueron significativamente mayores en el híbrido comercial que en la línea endocriada (Cuadro 4. 1).

Sólo la línea endocriada (y no el híbrido comercial) mostró alta sensibilidad embrionaria a la hipoxia a alta temperatura (evaluada como germinación de semillas, es decir, de aquenios sin pericarpio). Por lo tanto, para evaluar si este aumento en la sensibilidad a la hipoxia fue a través de una interferencia con el catabolismo del ABA que debería resultar en la acumulación de esta hormona, se midió el contenido de ABA en las semillas a lo largo del período de incubación y hasta antes que la germinación ocurra y no se encontraron cambios en el contenido de ABA. Los resultados mostraron que la hipoxia (i.e., 5% O<sub>2</sub>) no interfirió con el contenido de ABA en este genotipo a baja ni a alta temperatura de incubación (Figura 4. 5A y B). Aunque hay evidencia de que la hipoxia interfiere con el catabolismo del ABA por diferentes vías (i.e., desregulación de la enzima ABA 8'-hidroxilasa; Cutler et al., 2000), los resultados obtenidos no mostraron mayor acumulación de ABA cuando la incubación se realizó bajo hipoxia como sí había sido demostrado en cebada (Benech-Arnold et al., 2006; Mendiondo et al., 2010). Por el contrario, estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos en el Capítulo 3 que mostraron que la presencia del pericarpio no promueve la acumulación de ABA en el embrión en comparación con las semillas (sin pericarpio); además, en el Capítulo 3 se observó que mayores valores de ABA fueron obtenidos en semillas embebidas en comparación con aquenios intactos a lo largo del período de incubación a 30°C. Además, para evaluar si el aumento en la sensibilidad embrionaria a la hipoxia a 30°C mostrada únicamente por la línea endocriada fue a través de un incremento en la sensibilidad embrionaria al ABA, se midió la germinación de semillas de esta línea endocriada incubadas bajo diferentes concentraciones de ABA, dos concentraciones de oxígeno (5 y 21%) y dos temperaturas (12 y 30°C). El incremento de la concentración de ABA en el medio de incubación redujo consistentemente la germinación de las semillas de la línea endocriada ligeramente más a 30°C que a 12°C cuando la incubación se realizó en aire (21% O<sub>2</sub>) (Figura 4. 6), como se había observado previamente en el Capítulo 3. La incubación en hipoxia (5% O<sub>2</sub>) a 30°C redujo la germinación de las semillas, como se muestra en la Figura 4. 2B, y esto parece estar mediado por un incremento en la sensibilidad al ABA en comparación con 21% O<sub>2</sub> (Figura 4. 6B). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la alta sensibilidad a la hipoxia expresada a 30°C por las semillas de la línea endocriada está mediada, al

menos en parte, por un aumento de la respuesta al ABA (Figura 4. 6B), aunque sin cambios sustanciales en el metabolismo del ABA (Figura 4. 5B). El efecto de la alta temperatura de incubación sobre el incremento de la sensibilidad al ABA podría estar mediado por la hipoxia al embrión, debido a que una mayor temperatura aumenta la tasa metabólica (y el consumo de oxígeno) y reduce la solubilidad del gas.

El aumento de la sensibilidad a la hipoxia observada en semillas de la línea endocriada cuando fueron incubadas a 30°C podría explicar la expresión de la dormición en aquenios incubados a esa temperatura (Figura 4. 2B). Sin embargo, la dormición fue expresada también en aquenios del híbrido comercial incubados a 30°C incluso cuando las semillas exhibieron una sensibilidad mucho más baja a la hipoxia que las semillas de la línea endocriada (Figura 4. 2D y B). Por lo tanto, la dormición impuesta por el pericarpio que se expresa sólo a alta temperatura de incubación debe implicar, particularmente en el híbrido comercial pero posiblemente también en la línea endocriada, un aumento de la retención de oxígeno por el pericarpio, lo que conlleva a un incremento de la limitación de oxígeno al embrión hasta el punto reportado por Rolletschek et al. (2007). Según la literatura, esto podría deberse a: i) una mayor actividad de la polifenol oxidasa (Lenoir et al., 1986), ii) un aumento de la actividad microbiana (Heydecker y Chetram, 1971). Este capítulo se centró en la posibilidad de un aumento en la actividad microbiana. El pericarpio de girasol es un huésped natural para una variedad de comunidades microbianas, las cuales pueden sobrevivir como esporas (hongos) o endosporas (bacterias) por años hasta que la hidratación tenga lugar. Por lo tanto, en una primera instancia, se evaluó el consumo de oxígeno en pericarpios aislados incubados en ausencia y presencia de antibióticos (mezcla de fungicidas y bactericidas) para ambos genotipos. Se observó que el consumo de oxígeno en agua (como medio de incubación) con pericarpios aislados de la línea endocriada se incrementó marcadamente cuando la incubación se realizó a 30°C en comparación con el de pericarpios aislados incubados a 10°C (Figura 4. 7A). Sin embargo, cuando el tratamiento con antibióticos fue aplicado a pericarpios aislados de ambos genotipos incubados a alta temperatura, el consumo de oxígeno se redujo drásticamente, sugiriendo que el consumo se debió principalmente a la inhibición de la actividad de las comunidades microbianas del pericarpio, cuya actividad aumenta a alta temperatura de incubación en ausencia de antibióticos (Figura 4. 7). Otros mecanismos como, por ejemplo, algunas reacciones mediadas por enzimas en el pericarpio (i.e., polifenol oxidasa) no deben ser descartadas como parte de este mecanismo de limitación de oxígeno (como se ha observado en algunos granos de cereales como cebada y avena). Sin embargo, debido a que el tratamiento con antibióticos redujo el consumo de oxígeno en gran medida (y no se espera que estos componentes interfieran con la actividad de la polifenol oxidasa), el aumento de la actividad microbiana parece ser la causa central para explicar el incremento observado en el consumo de oxígeno en pericarpios aislados incubados a 30°C en ausencia de antibióticos (Figura 4. 7).

A su vez, cuando se aplicaron antibióticos para evaluar su efecto sobre la dormición impuesta por el pericarpio (evaluada como germinación del aquenio), el tratamiento con antibióticos incrementó la germinación del aquenio del híbrido comercial y de la línea endocriada, aunque el incremento no fue estadísticamente significativo para la línea endocriada (Cuadro 4. 2). Esto sugiere fuertemente que el alto consumo de oxígeno a alta temperatura de incubación se debe al aumento de la actividad microbiana que posiblemente limita la germinación del aquenio. Hasta donde se sabe, este es el primer trabajo que sugiere que la actividad de las comunidades microbianas en el pericarpio perjudica la germinación del aquenio a altas temperaturas de incubación. Sin embargo, las comunidades microbianas pueden afectar la germinación por diferentes vías. Por

ejemplo, el duro pericarpio de *Lepidium didymum* controla la germinación y esta dormición mecánica impuesta por el pericarpio es liberada por la actividad de hongos comunes asociados al fruto (colonización fúngica desde la superficie externa del pericarpio) (Sperber et al., 2017). Además, las asociaciones entre las semillas y los microorganismos asociados a las semillas, especialmente las bacterias endofíticas de las semillas, podrían ser beneficiosas para la germinación y el establecimiento de plántulas (Truyens et al., 2014). En este capítulo el aparente fracaso del tratamiento con antibióticos para superar totalmente la dormición en aquenios de la línea endocriada (Cuadro 4. 2) podría estar relacionado con la hiper-sensibilidad a la hipoxia mostrada por sus embriones cuando los mismos son incubados a 30°C (Figura 4. 2B). De hecho, el bajo, pero no obstante existente consumo de oxígeno en pericarpios tratados con antibióticos de la línea endocriada a 30°C (Figura 4. 7A), podría ser suficiente para imponer algún nivel de hipoxia que podría ser detectado por estos embriones. El incremento de la actividad metabólica debido a la alta temperatura de incubación (y, consecuentemente, el aumento de la demanda de oxígeno), junto con la menor solubilidad del oxígeno en agua, podría ser parte del mecanismo por el cual se impone esta condición de hipoxia. Por otro lado, en el híbrido comercial, en donde los embriones mostraron muy baja sensibilidad a la hipoxia (Figura 4. 2D), el tratamiento con antibióticos incrementó la germinación significativamente (Cuadro 4. 2). Estos resultados sugieren que, en este genotipo, la actividad de las comunidades microbianas en el pericarpio podría ser la principal responsable de la expresión de la dormición a alta temperatura de incubación, añadiéndose a la ya estricta restricción física de difusión de oxígeno impuesta por un pericarpio más grueso. De hecho, el número de capas de células del esclerénquima y el espesor del esclerénquima fueron significativamente mayores en el híbrido comercial que en la línea endocriada (Cuadro 4. 1). La actividad de las comunidades microbianas junto con un pericarpio más grueso podrían explicar por qué, a pesar de una menor sensibilidad a la hipoxia de los embriones, los aquenios del híbrido comercial mostraron una mayor sensibilidad a la hipoxia que aquellos de la línea endocriada (Figura 4. 2).

Los experimentos también incluyeron una evaluación de las comunidades microbianas asociadas al pericarpio, a través del recuento de colonias bacterianas. La aplicación de antibióticos redujo fuertemente los recuentos de colonias bacterianas para cada genotipo (Cuadro 4. 3); además, de acuerdo con la observada severa restricción de oxígeno al embrión impuesta por el pericarpio, la carga bacteriana en el pericarpio fue significativamente mayor en el híbrido comercial que en la línea endocriada. Además se adentró en las comunidades microbianas a través de los perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP por sus siglas en inglés) e Índice de Diversidad de Shannon (Índice H) para bacterias y hongos con el objetivo de detectar similitudes entre genotipos en términos de comunidades microbianas asociadas al pericarpio. Los CLPP difirieron entre los dos genotipos (Figura 4. 8), de acuerdo con Nelson et al. (2018) para semillas de otros cultivos. El efecto de los antibióticos aplicados al medio de incubación tuvo un fuerte impacto en los perfiles fúngicos y bacterianos de ambos genotipos (Figura 4. 8). Por lo tanto, el reducido consumo de oxígeno observado en presencia de antibióticos podría deberse tanto a una reducción en la proliferación microbiana total junto con cambios en la composición específica. Estos cambios a nivel microbiológico podrían explicar la caída observada en el consumo de oxígeno en presencia de antibióticos, los cuales, de hecho, aumentan la germinación a 30°C posiblemente a través de la atenuación de la hipoxia. A pesar de que las fuentes carbonadas dentro de las microplacas no representan las mismas condiciones que las de las pruebas de germinación, los CLPP proporcionan información sobre la funcionalidad potencial de

las comunidades microbianas (Preston-Mafham et al., 2002). Además, el Índice H difirió significativamente entre los aquenios de tratamiento control y los del tratamiento con antibióticos en el caso de la línea endocriada para bacterias (Cuadro 4. 4). Estos resultados sugieren que cada genotipo tuvo diferente carga bacteriana y diferentes comunidades bacterianas y fúngicas, como lo reflejan sus contrastantes patrones de consumo de oxígeno. Este capítulo tuvo, como uno de sus objetivos, evaluar el efecto que las comunidades microbianas tienen sobre el consumo de oxígeno y la germinación a 30°C, pero no se propuso caracterizar estas comunidades más allá de la información que se puede derivar del análisis de CLPP. Las diferencias en la composición de las comunidades microbianas podrían explicarse por el propio genotipo de la planta (e.g., tamaño de la semilla, anatomía de la semilla) pero también por factores abióticos (e.g., prácticas de manejo a campo, métodos de cosecha, procesamiento y almacenamiento de la semilla) (Barret et al., 2015). Barret et al. (2015) trabajaron con muestras de semillas de varias plantas pertenecientes a diferentes variedades, especies, géneros y familias y demostraron que la estructura de la microbiota de la semilla parece estar explicada por factores abióticos, como la localización geográfica de la región de producción y el año de cosecha. En el presente capítulo, la carga y diversidad microbiana descriptas aquí sólo corresponden a estos dos genotipos que pertenecen a un lote de producción determinado bajo ciertas condiciones ambientales y, por lo tanto, no puede ser extrapolado a otras situaciones (motivo por el cual una caracterización de estas comunidades a un nivel específico sería poco útil).

Los tratamientos de semillas en girasol usualmente incluyen fungicidas para evitar la infestación fúngica (como lo recomienda Viswanathan, 1996), pero no bactericidas dirigidos específicamente a las bacterias. La conocida lucha entre hongos y bacterias implica la producción de químicos tóxicos naturales dirigidos el uno al otro. Si la producción de antibióticos naturales producidos por hongos es eliminada por la aplicación de fungicidas (que se usan comúnmente en semillas comerciales) podría ocurrir un desequilibrio hacia la proliferación de bacterias, lo que resultaría en una absorción de oxígeno más alta y aumento de la dormición a altas temperaturas a las cuales las bacterias se dividen más rápido.

En resumen, los resultados muestran que ambos genotipos expresan dormición impuesta por el pericarpio a alta temperatura de incubación. Sin embargo, no es posible derivar un modelo fisiológico único para ambos genotipos. Los genotipos mostraron diferentes valores de umbral de oxígeno para la inhibición de la germinación, siendo más bajo para el híbrido comercial que para la línea endocriada. En la línea endocriada, la principal limitación para la germinación del aquenio estuvo impuesta por la alta sensibilidad embrionaria a la hipoxia, que es aumentada a alta temperatura de incubación, la cual, en combinación con el aumento del consumo de oxígeno en pericarpios aislados, resultó en expresión de la dormición. En aquenios del híbrido comercial, en cambio, la principal limitación para la germinación provino principalmente de la presencia del pericarpio que representa una severa restricción cuando la actividad de las comunidades microbianas en el pericarpio es aumentada por la alta temperatura de incubación.

# **CAPÍTULO 5**

## **Discusión general**



## **CAPÍTULO 5**

### **Discusión general**

#### **Resumen**

En este capítulo: i) se retoma el marco conceptual de la problemática abordada, ii) se contrastan las hipótesis planteadas en el Capítulo 1 en función de los resultados obtenidos, iii) se plantea un modelo de respuesta a la dormición, que contempla los dos genotipos empleados a lo largo de esta tesis, a modo de integrar las contribuciones al estado de conocimiento y iv) se detallan implicaciones para futuras investigaciones.



### 5.1. Marco conceptual de la problemática abordada

La dormición es una condición interna de la semilla que impide su germinación bajo condiciones hídricas térmicas y gaseosas que, de lo contrario, hubieran sido apropiadas para la germinación (Benech-Arnold et al., 2000). Si bien esta condición tiene una fuerte importancia adaptativa en especies silvestres, es una característica indeseable en especies domesticadas (Bewley, 1997). La dormición representa un problema importante para la producción de cultivos porque la misma implica un retraso sustancial para la siembra inmediata y, en el caso de las empresas semilleras, dificulta o directamente impide la comercialización (Roselló et al., 2016). Por ello, es crucial eliminar la dormición en especies que aún la tienen.

El cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.) es un buen modelo para estudiar la dormición debido a que usualmente sus frutos están profundamente dormidos a cosecha (Corbineau y Côme, 2003; Benech-Arnold, 2004). En programas de mejoramiento de este cultivo, la dormición no sólo limita el número de ciclos del cultivo por año sino que también conduce a la asincronía en el tiempo a floración, restringiendo, de esta manera, la oportunidad de hacer cruza entre plantas (Marchetti, 2012). Sin embargo, la dormición es un atributo difícil de manipular por la complejidad que involucra ya que se encuentra determinada principalmente por factores genéticos pero con una sustancial influencia del ambiente (i.e., factores exógenos) durante el desarrollo de la semilla (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006) y su expresión depende mayoritariamente de las condiciones ambientales durante la imbibición de la semilla (Hoang et al., 2014). Los mecanismos fisiológicos involucrados en el control de la dormición varían entre especies; por lo tanto, se deben dilucidar los mecanismos propios de cada especie, incluso de cada genotipo dentro de una misma especie.

Los aquenios (i.e., frutos) de algunos genotipos de girasol a menudo presentan dormición fisiológica a cosecha (Rodríguez et al., 2011). La dormición fisiológica puede estar impuesta por las cubiertas (i.e., tejidos que recubren al embrión), deberse a que la misma está impuesta al embrión, o ser una combinación de ambas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Es conocido que, en el girasol, la dormición fisiológica a cosecha obedece a una combinación de dormición embrionaria y dormición por cubiertas (Benech-Arnold, 2004) y que, si las semillas son secadas y almacenadas a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad relativa 50%), la dormición embrionaria es eliminada (Corbineau et al., 1990; Andrade et al., 2015); sin embargo, la dormición por cubiertas puede persistir por varias semanas e incluso meses (Benech-Arnold, 2004). Las cubiertas se refieren a cualquier tejido que recubra al embrión (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Szemruch et al., 2014) y, en el caso del girasol, son el pericarpio, la cubierta seminal y el endosperma. Estas cubiertas pueden imponer dormición a través de limitar el ingreso de oxígeno al embrión (i.e., hipoxia), siendo esta restricción dependiente de aspectos físicos y bioquímicos de estas cubiertas (Corbineau y Côme, 1995). Dicha limitación de oxígeno al embrión puede, a su vez, interferir con el metabolismo y sensibilidad de inhibidores de la germinación, como es el caso del ácido abscísico (ABA) (Bewley y Black, 1982; Benech-Arnold et al., 2006). A pesar de que, como se dijo más arriba, la dormición impuesta por el pericarpio es la que causa más problemas a la producción, llama la atención que escasas investigaciones se han llevado a cabo sobre los tejidos que recubren al embrión que participan en la imposición de la dormición por cubiertas. A raíz de este vacío de conocimiento, en la presente tesis emergió la necesidad de dilucidar en girasol los mecanismos fisiológicos involucrados en el control de la dormición impuesta por cubiertas, haciendo foco en el papel del pericarpio y se buscó desarrollar tecnologías que permitan eliminarla a escala industrial. Para ello, esta tesis se propuso: i) evaluar el papel del pericarpio en la

imposición de la dormición y, ligado a esto, la temperatura a la cual se expresa esa dormición (Capítulo 2), ii) estudiar la posibilidad de atenuar esta dormición impuesta por el pericarpio con agentes externos usualmente usados para dormición embrionaria (Capítulo 2), iii) diseñar tecnologías para la eliminación de la dormición impuesta por el pericarpio a escala de industria semillera, para lo cual se evaluó la factibilidad del uso de un agente oxidante, como fue el hipoclorito de sodio (Capítulo 3), y iv) analizar el posible papel del pericarpio en la imposición de una condición de hipoxia al embrión a altas temperaturas de incubación (i.e., 30°C) y, consecuentemente, estudiar en qué medida la hipoxia inhibe la germinación a esas temperaturas, para lo cual se evaluó si esta inhibición está mediada por interferencias en el metabolismo del ABA y/o alteraciones en la sensibilidad a esta hormona (Capítulo 4). Asimismo, se dilucidó la naturaleza de una eventual restricción a la llegada de oxígeno al embrión impuesta por el pericarpio (Capítulo 4).

Para cumplir con lo arriba mencionado, se trabajó con una línea endocriada de girasol que es usada como parental macho para donante de polen de múltiples híbridos comerciales para aceite y presenta una dormición persistente (M. Gerbaldo, Dow AgroSciences, comunicación personal, 2010). Durante el avance de la tesis, se determinó que esta línea endocriada presenta dormición impuesta sólo por el pericarpio, cuya expresión fue evidente únicamente a altas temperaturas de incubación (i.e., 25 y 30°C). Posteriormente, en el Capítulo 4, se incorporó al análisis un lote de aquenios perteneciente a un híbrido comercial de girasol que también presenta este tipo de dormición (impuesta por el pericarpio y expresada a altas temperaturas de incubación), para evaluar hasta qué punto este modelo fisiológico derivado de la línea endocriada puede ser generalizado a otros genotipos con dormición impuesta por el pericarpio.

## **5.2. Contrastación de las hipótesis planteadas en el Capítulo 1**

Hipótesis 1: “En aquenios con dormición impuesta por el pericarpio, la presencia del mismo impone una condición de hipoxia al embrión, afectando el metabolismo del ABA”.

Hipótesis 2: “La condición de hipoxia al embrión, impuesta por el pericarpio, interfiere con la sensibilidad de los embriones al ABA”.

Los resultados confirmaron que en la línea endocriada la dormición estuvo impuesta sólo por el pericarpio y que su expresión fue evidente únicamente a altas temperaturas de incubación (i.e., 25°C y 30°C) (Figura 2. 1, Figura 2. 3 y Cuadro 2. 2). Cuando se evaluó si la alta temperatura de incubación (i.e., 30°C) sólo permitía que los aquenios expresaran dormición o si esa temperatura además inducía a dormición secundaria, se observó que esta temperatura permitió que los aquenios expresaran dormición y, además, indujo a dormición secundaria (Figura 2. 4). A su vez, los aquenios que fueron incubados inicialmente a 30°C durante 5 y 3 d y fueron luego incubados a 12°C por el resto del período de incubación, alcanzaron mayores porcentajes de germinación cuanto menor fue el tiempo de exposición a alta temperatura (Figura 2. 4). El impacto de este comportamiento a escala de cultivo quedó demostrado con los experimentos detallados en el Capítulo 3 (Figura 3. 3 y Figura 3. 4). Cuando se comparó la acumulación de ABA entre aquenios y semillas (i.e., aquenios sin pericarpio) durante la incubación a 30°C, no se detectó ninguna diferencia (Figura 2. 5). En contraste, la sensibilidad de las semillas al ABA se incrementó varias veces cuando la incubación se llevó a cabo a altas temperaturas (Cuadro 2. 3), sugiriendo que la menor germinación a 25 y 30°C puede explicarse, en parte, por un aumento en la sensibilidad al ABA. Posteriormente, en el Capítulo 4 se investigó el rol del pericarpio como una limitación de oxígeno al embrión (i.e., hipoxia), como fue demostrado por Corbineau y Côme (1995). Para ello, se

incubaron aquenios y semillas de esta línea endocriada a diferentes concentraciones de oxígeno (3, 5, 10, 15 y 21%) y temperaturas (12 y 30°C). La incubación de semillas a concentraciones menores de 21% O<sub>2</sub> (i.e., hipoxia) se realizó para simular el efecto de la limitación de oxígeno impuesta al embrión por el pericarpio, mientras que la incubación de aquenios a concentraciones menores de 21% O<sub>2</sub> se llevó a cabo en un intento de generar una doble restricción a la disponibilidad de oxígeno. La germinación fue medida al final del experimento y los resultados arrojaron que la sensibilidad embrionaria a la hipoxia cuando la incubación se realizó a 30°C explicó la dormición impuesta por el pericarpio expresada a esa temperatura (la germinación tanto de aquenios como de semillas disminuyó hasta valores semejantes bajo hipoxia) (Figura 4. 2B). En función de estos resultados, el contenido de ABA de semillas incubadas bajo hipoxia (i.e., 5% O<sub>2</sub>) y aire (i.e., 21% O<sub>2</sub>) fue medido en ejes embrionarios y cotiledones, por separado, para evaluar si el aumento en la sensibilidad embrionaria a la hipoxia que está detrás de la expresión de la dormición a alta temperatura, está mediado por una interferencia en el metabolismo del ABA. El contenido de ABA en cotiledones fue 4 veces mayor que en ejes embrionarios y esta diferencia persistió durante la incubación tanto a 12°C como a 30°C (Figura 4. 5A y B). Sin embargo, la hipoxia no produjo diferencias consistentes en el contenido de ABA en comparación con la incubación en aire tanto para cotiledones como para ejes embrionarios (Figura 4. 5A y B) y esto sugiere que la expresión de la dormición impuesta por el pericarpio a 30°C no es mediada por un incremento en el contenido de ABA. Subsiguientemente, se evaluó la sensibilidad al ABA en semillas incubadas bajo diferentes concentraciones de oxígeno (5 y 21% O<sub>2</sub>) y temperaturas (12 y 30°C) y se observó que la hipoxia incrementa la sensibilidad al ABA, así como la alta temperatura de incubación (Figura 4. 6). Estos resultados, en su conjunto, permiten rechazar parcialmente la Hipótesis 1 debido a que la condición de hipoxia al embrión, que estuvo impuesta por el pericarpio, no parece interferir con el metabolismo del ABA. La Hipótesis 2, por su parte, se acepta debido a que el efecto del pericarpio, a través de la hipoxia, sí afectó la sensibilidad a esta hormona.

### 5.3. Modelo de respuesta a la dormición

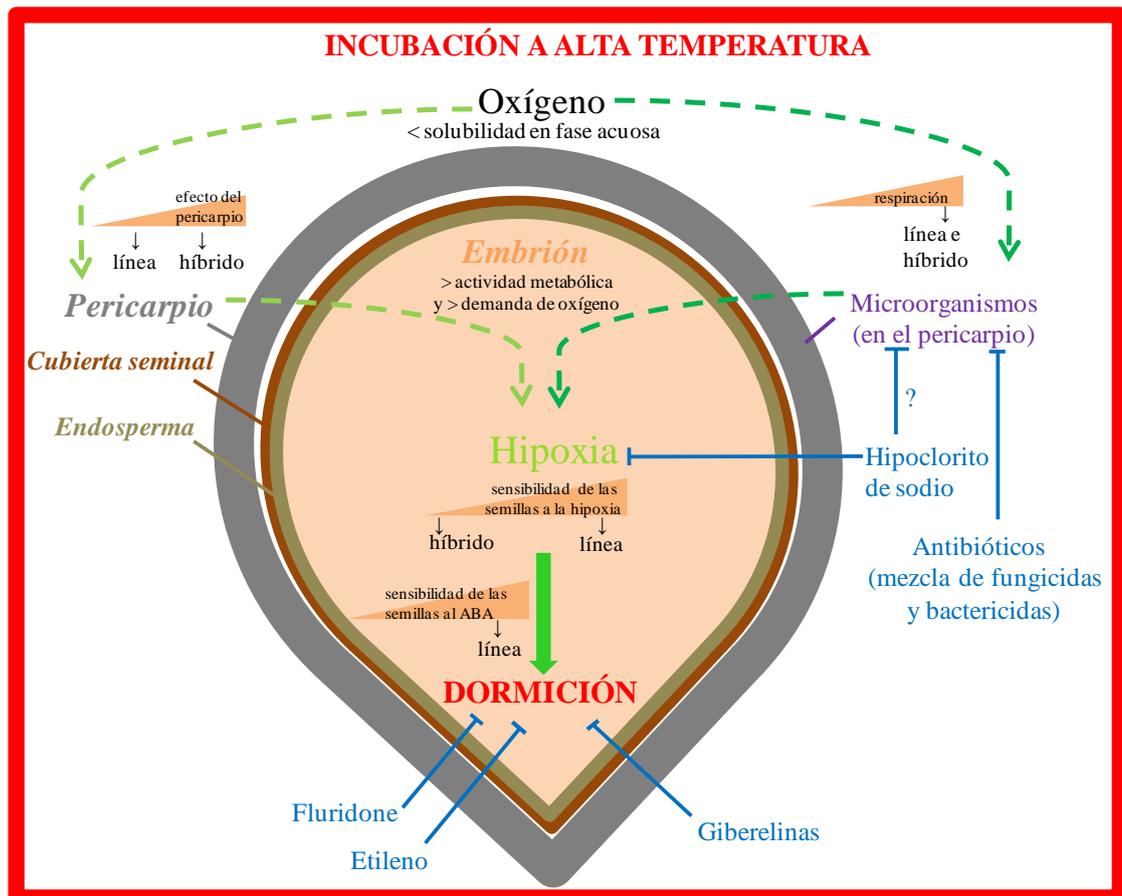
Los resultados obtenidos muestran que, tanto en la línea endocriada como en el híbrido comercial, la dormición está impuesta por el pericarpio y su expresión ocurre sólo a altas temperaturas de incubación (30°C). Sin embargo, no es posible derivar un único patrón fisiológico para estos dos genotipos. Estos patrones se encuentran gobernados por la temperatura a la que se hayan expuestos los aquenios durante la incubación (sólo se expresan a 30°C), pero varían los componentes intervinientes en la respuesta a la dormición en cada genotipo.

Los diferentes tejidos que recubren al embrión, entre ellos el pericarpio, pueden imponer dormición a través de la interferencia con el intercambio gaseoso (e.g., entrada de oxígeno y/o salida de dióxido de carbono) (Corbineau y Côme, 1995). Este impedimento al intercambio de gas da como resultado la restricción de oxígeno al embrión (i.e., hipoxia). Esta restricción de la difusión de oxígeno por parte de las cubiertas depende de propiedades físicas, como son la estructura y espesor de estas cubiertas, y también de propiedades bioquímicas de estas cubiertas (Corbineau y Côme, 1995). En esta tesis se impuso hipoxia a la línea endocriada y al híbrido comercial mediante la incubación de semillas a diferentes concentraciones de oxígeno (5 y 21% O<sub>2</sub>) y temperaturas (12 y 30°C). Ambos genotipos mostraron diferencias en su sensibilidad embrionaria a la hipoxia, especialmente a alta temperatura de incubación (30°C). La sensibilidad embrionaria a la hipoxia cuando la incubación se realizó a 30°C

explicó la dormición impuesta por el pericarpio expresada a 30°C en la línea endocriada pero no en el híbrido comercial. De hecho, se requirieron valores de oxígeno inferiores al 3% para inhibir la germinación de semillas en el híbrido comercial y esto hizo evidente un efecto muy fuerte del pericarpio en este genotipo. En cambio, la alta sensibilidad a la hipoxia exhibida por la línea endocriada a alta temperatura de incubación, estuvo mediado por una interferencia en la sensibilidad al ABA.

A su vez, la bibliografía indica que en la limitación de la difusión de oxígeno al embrión por parte de las cubiertas puede estar involucrada la respiración de microorganismos presentes en la superficie del fruto por competencia con este gas (Heydecker y Chetram, 1971). Sin embargo, prácticamente no hay ejemplos en la literatura en los que la relación entre actividad microbiana en las cubiertas seminales e hipoxia impuesta al embrión como determinante de la imposición de dormición, hubiera sido puesta a prueba experimentalmente. Para explorar esta posibilidad (que no fue a la que se le adjudicó mayor peso al principio de esta tesis) se cuantificó el consumo de oxígeno durante la incubación de pericarpios aislados, como un estimador de la actividad de sus comunidades microbianas. A alta temperatura de incubación, la actividad microbiana fue alta para ambos genotipos, lo que implica consumo oxígeno que no queda disponible para el embrión. Esto permite concluir que los aspectos biológicos de las cubiertas tienen un papel importante en la imposición de dormición. Además, en este escenario de alta temperatura de incubación, no sólo aumenta la respiración de microorganismos sino que también se incrementa la actividad metabólica (y, consecuentemente, el aumento de la demanda de oxígeno) (Hills y van Staden, 2003), junto con la menor solubilidad del oxígeno en agua (Hoang et al., 2013).

Por tanto, en la línea endocriada, la principal limitación para la germinación del akenio estuvo impuesta por la alta sensibilidad embrionaria a la hipoxia, que es aumentada a alta temperatura de incubación, la cual, en combinación con el aumento del consumo de oxígeno por la actividad (respiración) microbiana, resultó en expresión de la dormición. En akenios del híbrido comercial, en cambio, la principal limitación para la germinación provino principalmente de la presencia del pericarpio (su pericarpio tiene mayor número de capas de células del esclerénquima y espesor del esclerénquima que el pericarpio de la línea endocriada), el cual representa una severa restricción cuando la actividad de las comunidades microbianas en el pericarpio es aumentada por la alta temperatura de incubación. El modelo fisiológico establecido, y sus variantes, se resumen en el esquema presentado en la Figura 5. 1.



**Figura 5. 1.** Modelo de respuesta a la dormición donde se muestran los distintos componentes y su impacto, para la línea (línea endocriada) y el híbrido (híbrido comercial).

La aplicación del tratamiento con antibióticos (mezcla de fungicidas y bactericidas) al medio de incubación de aquenios de la línea endocriada y del híbrido comercial, redujo el consumo de oxígeno a un cuarto y a un noveno en pericarpios de la línea endocriada y del híbrido comercial, respectivamente. Esto demostró que el consumo se debió, principalmente, a la inhibición de la actividad de las comunidades microbianas del pericarpio, cuya actividad aumenta a alta temperatura de incubación en ausencia de antibióticos. Esta inhibición de la actividad microbiana permitió aumentar la germinación en ambos genotipos cuando la incubación de aquenios se llevó a cabo a alta temperatura.

Además, otros agentes externos usualmente usados para dormición embrionaria, como son etileno, giberelinas (GA) y fluridone, fueron aplicados a la línea endocriada (únicamente). La adición de etileno o giberelinas a estos aquenios permitió la eliminación de la dormición embrionaria a 25 y 30°C, al igual que el fluridone en aquenios incubados a 30°C. En esta misma línea endocriada, se evaluó la factibilidad de un agente oxidante, como fue el uso del hipoclorito de sodio (NaClO), para eliminar la dormición, aplicado en condiciones de laboratorio y también a escala de industria semillera. La aplicación de esta fuente oxidante aumentó la geminación durante la incubación de aquenios a altas temperaturas (en condiciones laboratorio) como así también mejoró la emergencia a campo en comparación con los aquenios no tratados. Posiblemente el hipoclorito de sodio tenga algún efecto sobre las comunidades microbianas del pericarpio.

#### **5.4. Aplicaciones futuras**

La dormición en girasol puede representar una limitación para el establecimiento del cultivo y cruzamiento entre plantas. En esta tesis se ahondó en las bases fisiológicas del fenómeno de la dormición en dos genotipos de girasol con dormición impuesta por el pericarpio, cuya expresión fue evidente a altas temperaturas de incubación, y se detectaron posibles puntos de acción para superar este problema. La dormición impuesta por el pericarpio en la línea endocriada fue posible de ser atenuada, en condiciones de laboratorio, con agentes externos usualmente usados para dormición embrionaria como son etileno, giberelinas y fluridone.

Esta tesis, además, se propuso diseñar tecnologías para eliminar la dormición a escala industrial. Para ello, en una primera instancia se abordó este desafío utilizando un agente oxidante como fue el hipoclorito de sodio en la línea endocriada. La dormición se pudo superar, en gran parte, acondicionando a los aquenios con este agente oxidante y, a su vez, este acondicionamiento fue posible realizarlo incluso a escala industrial, con mensurables beneficios a campo. El descubrimiento de que un tratamiento con antibióticos (mezcla de fungicidas y bactericidas) aplicado a aquenios de la línea endocriada y del híbrido comercial durante la incubación a altas temperaturas, terminaba la dormición, también augura una tecnología promisorio de aplicación a escala de industria semillera, al mismo tiempo que permite derivar algunas recomendaciones prácticas. Este tratamiento permitió reducir el consumo de oxígeno por parte de las comunidades microbianas y, en consecuencia, aumentó la germinación a 30°C. Este último resultado conlleva a replantearse los tratamientos de semillas comúnmente utilizados en la industria. En girasol, estos tratamientos usualmente incluyen fungicidas pero no bactericidas dirigidos específicamente a las bacterias. La lucha largamente conocida entre hongos y bacterias implica la producción de químicos tóxicos naturales dirigidos el uno al otro. Si la producción de antibióticos naturales producidos por hongos es eliminada por la aplicación de fungicidas (que son empleados comúnmente en semillas comerciales) podría ocurrir un desequilibrio hacia la proliferación de bacterias, lo que resultaría en una absorción de oxígeno más alta y aumento de la dormición a altas temperaturas a las cuales las bacterias se dividen más rápido. Por tanto, la opción de curar las semillas en la industria semillera con una mezcla de fungicidas y bactericidas parece promisorio para eliminar la dormición a escala industrial.

En conjunto, esta tesis contribuyó a dilucidar las bases fisiológicas de la dormición impuesta por el pericarpio en girasol, desarrolló una evidente solución aplicable a escala industrial, que fue la utilización del hipoclorito de sodio, y, a su vez, planteó la posibilidad de aplicar un tratamiento de fungicidas y bactericidas durante el curado de las semillas en la industria semillera. A partir de esta tesis pueden surgir nuevas líneas de investigación enfocadas en mejorar el diseño de estas tecnologías para que sean adquiridas en la industria semillera de manera masiva.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ali-Rachedi, S., D. Bouinot, M.H. Wagner, M. Bonnet, B. Sotta, et al. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219: 479–488.
- Allinne, C., P. Maury, A. Sarrafi, y P. Grieu. 2009. Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions. *Plant Sci.* 177: 349–359. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.07.002.
- Andrade, A., N. Riera, L. Lindstrom, S. Alemano, D. Alvarez, et al. 2015. Pericarp anatomy and hormone profiles of cypselas in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. *Plant Biol.* 17: 351–360. doi: 10.1111/plb.12244.
- Anton, G.F., M. Joița-Păcureanu, y A. Cucerevii. 2015. Diversification of sunflower germplasm for different economically important characteristics. *Sci. Pap. Ser. A. Agron.* LVIII: 123–127.
- Baldini, M., y G. Vannozzi. 1996. Crop management practices and environmental effects on hullability in sunflower hybrids. *Helia* 19: 47–62.
- Barret, M., M. Briand, S. Bonneau, A. Prévieux, S. Valière, et al. 2015. Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 1257–1266. doi: 10.1128/aem.03722-14.
- Baskin, J.M., y C.C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14: 1–16. doi: 10.1079/ssr2003150.
- Batlla, D., y R.L. Benech-Arnold. 2010. Predicting changes in dormancy level in natural seed soil banks. *Plant Mol. Biol.* 73: 3–13. doi: 10.1007/s11103-010-9601-z.
- Batlla, D., y R.L. Benech-Arnold. 2015. A framework for the interpretation of temperature effects on dormancy and germination in seed populations showing dormancy. *Seed Sci. Res.* 25: 147–158. doi: 10.1017/s0960258514000452.
- Batlla, D., B.C. Kruk, y R.L. Benech-Arnold. 2004. Modelling changes in dormancy in weed soil seed banks: implications for the prediction of weed emergence. En: Benech-Arnold, R.L. y Sánchez, R.A., eds., *Handbook of seed physiology: Applications to agriculture*. Haworth Press, New York. p. 245–264.
- Baute, G.J., N.C. Kane, C.J. Grassa, Z. Lai, y L.H. Rieseberg. 2015. Genome scans reveal candidate domestication and improvement genes in cultivated sunflower, as well as post-domestication introgression with wild relatives. *New Phytol.* 206: 830–838. doi: 10.1111/nph.13255.
- Bazin, J., D. Batlla, S. Dussert, H. El-Maarouf-Bouteau, y C. Bailly. 2011. Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *J. Exp. Bot.* 62: 627–640. doi: 10.1093/jxb/erq314.
- Beaudoin, N., C. Serizet, F. Gosti, y J. Giraudat. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103–1115.
- Benech-Arnold, R.L. 2004. Inception, maintenance, and termination of dormancy in grain crops: Physiology, genetics, and environmental control. En: Benech-Arnold, R.L. y Sánchez, R.A., eds., *Handbook of seed physiology: Applications to agriculture*. Food Products Press, New York, USA. p. 169–198.
- Benech-Arnold, R.L., M. Fenner, y P.J. Edwards. 1992. Changes in dormancy level in *Sorghum halepense* seeds induced by water stress during seed development. *Funct. Ecol.* 6: 596–605.

- Benech-Arnold, R.L., M.C. Giallorenzi, J. Frank, y V. Rodriguez. 1999. Termination of hull-imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. *Seed Sci. Res.* 9: 39–47. doi: 10.1017/s0960258599000045.
- Benech-Arnold, R.L., N. Gualano, J. Leymarie, D. Côme, y F. Corbineau. 2006. Hypoxia interferences with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *J. Exp. Bot.* 57: 1423–1430. doi: 10.1093/jxb/erj122.
- Benech-Arnold, R., R. Sánchez, F. Forcella, B. Kruk, y C. Ghersa. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *F. Crop. Reseach* 67: 105–122. doi: 10.1016/s0378-4290(00)00087-3.
- Bertero de Romano, A., y A.N. Vázquez. 2003. Origin of the argentine sunflower varieties. *Helia* 26: 127–136. doi: 10.2298/hel0338127d.
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055–1066. doi: 10.1105/tpc.9.7.1055.
- Bewley, J.D., y M. Black. 1982. *Physiology and biochemistry of seeds.*
- Bewley, J.D., y M. Black. 1994. Dormancy and the control of germination. En: Bewley, J.D. y Black, M., eds., *Seeds. Physiology of development and germination.* 2° ed. Plenum Press, New York, London. p. 199–271.
- Bianco, J., G. Garello, y M.T. Le Page-Degivry. 1994. Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. *Seed Sci. Res.* 4: 57–62. doi: 10.1017/s0960258500002026.
- Black, M., J.D. Bewley, y P. Halmer. 2006. *The encyclopedia of seeds: Science, technology and uses.* CAB International, Cambridge, USA.
- Blackman, B.K., D.A. Rasmussen, J.L. Strasburg, A.R. Raduski, J.M. Burke, et al. 2011. Contributions of flowering time genes to sunflower domestication and improvement. *Genetics* 187: 271–287. doi: 10.1534/genetics.110.121327.
- Bodrone, M.P., M.V. Rodríguez, S. Arisnabarreta, y D. Batlla. 2017. Maternal environment and dormancy in sunflower: the effect of temperature during fruit development. *Eur. J. Agron.* 82: 93–103. doi: 10.1016/j.eja.2016.10.007.
- Bukhsh, M.A.A.H.A., J. Iqbal, S. Kaleem, A. Wasaya, y M. Ishaque. 2011. Qualitative analysis of spring planted sunflower hybrids as influenced by varying nutritional area. *Pakistan J. Nutr.* 10: 291–295.
- Burke, J.M., S.J. Knapp, y L.H. Rieseberg. 2005. Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. *Genetics* 171: 1933–1940. doi: 10.1534/genetics.104.039057.
- Burke, J.M., S. Tang, S.J. Knapp, y L.H. Rieseberg. 2002. Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 161: 1257–1267.
- Canavar, Ö., F. Ellmer, y F.M. Chmielewski. 2010. Investigation of yield and yield components of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in the ecological conditions of Berlin (Germany). *Helia* 33: 117–130. doi: 10.2298/hel1053117c.
- Chandler, J.M., y C.C. Jan. 1985. Comparison of germination techniques for wild *Helianthus* seeds. *Crop Sci.* 25: 356–358.
- Chibani, K., S. Ali-Rachedi, C. Job, D. Job, M. Jullien, et al. 2006. Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 142: 1493–1510. doi: 10.1104/pp.106.087452.
- Connor, D.J., y A.J. Hall. 1997. Sunflower physiology. En: Schneiter, A.A., ed., *Sunflower technology and production.* American Society of Agronomy. Madison, WI, USA. p. 113–182.

- Corbineau, F., S. Bagniol, y D. Côme. 1990. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed dormancy and its regulation by ethylene. *Isr. J. Bot.* 39: 313–325. doi: 10.1080/0021213x.1990.10677156.
- Corbineau, F., y D. Côme. 1995. Control of seed germination and dormancy by the gaseous environment. En: Kigel, J. y Galili, G., eds., *Seed development and germination*. CRC Press. p. 397–424.
- Corbineau, F., y D. Côme. 2003. Germination of sunflower seeds as related to ethylene synthesis and sensitivity - an overview. En: Vendrell, M., Klee, H., Pech, J.C., y Romojaro, F., eds., *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene III*. IOS Press, Amsterdam. p. 216–221.
- Corbineau, F., R.M. Rudnicki, y D. Côme. 1988. Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by high temperature. Possible involvement of ethylene biosynthesis. *Physiol. Plant.* 73: 368–373. doi: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb00612.x.
- Corbineau, F., Q. Xia, C. Bailly, y H. El-Maarouf-Bouteau. 2014. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front. Plant Sci.* 5: 539. doi: 10.3389/fpls.2014.00539.
- Cutler, S.R., P.L. Rodriguez, R.R. Finkelstein, y S.R. Abrams. 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 651–679. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112122.
- Cutler, A.J., P.A. Rose, T.M. Squires, M.K. Loewen, A.C. Shaw, et al. 2000. Inhibitors of abscisic acid 8'-hydroxylase. *Biochemistry* 39: 13614–13624.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. *Manual de técnicas en histología vegetal*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Dagustu, N., G. Bayram, M. Sincik, y M. Bayraktaroglu. 2012. The short breeding cycle protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Turkish J. F. Crop.* 17: 124–128.
- de Estrada, E., M. Vázquez, D. Moreno, S. Bravo, J. Amores, et al. 2012. Sunflower seed production: past, present, and perspectives. *Proc. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina*. p. 118–125.
- de la Vega, A.J., I.H. DeLacy, y S.C. Chapman. 2007. Changes in agronomic traits of sunflower hybrids over 20 years of breeding in central Argentina. *F. Crop. Res.* 100: 73–81. doi: 10.1016/j.fcr.2006.05.007.
- Debeaujon, I., y M. Koornneef. 2000. Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol.* 122: 415–424. doi: 10.1104/pp.122.2.415.
- Denis, L., V. Coelho, y F. Vear. 1994. Pericarp structure and hullability in sunflower inbred lines and hybrids. *Agronomie* 14: 453–461. doi: 10.1051/agro:19940704.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, et al. 2014. *InfoStat versión 2014*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Di Salvo, L.P., L. Ferrando, A. Fernández-Scavino, y I.E. García de Salamone. 2018. Microorganisms reveal what plants do not: wheat growth and rhizosphere microbial communities after *Azospirillum brasilense* inoculation and nitrogen fertilization under field conditions. *Plant Soil*. doi: 10.1007/s11104-017-3548-7.
- Di Salvo, L.P., y I.E. García de Salamone. 2012. Evaluation of soil-microbial communities by their CLPP. Standardization of a laboratory technique to replace commercial available microplates. *Ecol. Austral* 22: 129–136.
- Doebley, J.F., B.S. Gaut, y B.D. Smith. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309–1321. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.006.

- Drew, R.L.K., y P.A. Brocklehurst. 1984. Investigations on the control of lettuce seed germination at high temperatures. *J. Exp. Bot.* 35: 986–993. doi: 10.1093/jxb/35.7.986.
- Edelstein, M., F. Corbineau, J. Kigel, y H. Nerson. 1995. Seed coat structure and oxygen availability control low-temperature germination of melon (*Cucumis melo*) seeds. *Physiol. Plant.* 93: 451–456. doi: 10.1111/j.1399-3054.1995.tb06842.x.
- Edelstein, M., y G.E. Welbaum. 2011. Seed O<sub>2</sub> uptake and germination of cold-tolerant and cold-intolerant cultivars of muskmelon. *Crop Sci.* 51: 810–817. doi: 10.2135/cropsci2010.05.0285.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Y. Sajjad, J. Bazin, N. Langlade, S.M. Cristescu, et al. 2015. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant, Cell Environ.* 38: 364–374. doi: 10.1111/pce.12371.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of Seed Plants*. 2<sup>o</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Filippi, C.V., N. Aguirre, J.G. Rivas, J. Zubrzycki, A. Puebla, et al. 2015. Population structure and genetic diversity characterization of a sunflower association mapping population using SSR and SNP markers. *BMC Plant Biol.* 15: 52. doi: 10.1186/s12870-014-0360-x.
- Filippi, C., J. Zubrzycki, V. Lía, R.A. Heinz, N.B. Paniego, et al. 2014. Genetics and genomics applied to sunflower breeding. En: Arribas, J.I., ed., *Sunflowers: Growth and development, environmental influences and pests/diseases*. Nova Science Publishers, New York. p. 61–94.
- Finch-Savage, W.E., y G. Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501–523. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x.
- Finkelstein, R. 2013. Abscisic acid synthesis and response. *Arab. B.* 11: e0166. doi: 10.1199/tab.0166.
- Finkelstein, R.R., S.S.L. Gampala, y C.D. Rock. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15–S45.
- Finkelstein, R., W. Reeves, T. Ariizumi, y C. Steber. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 387–415. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740.
- Gandhi, S.D., A.F. Heesacker, C.A. Freeman, J. Argyris, K. Bradford, et al. 2005. The self-incompatibility locus (S) and quantitative trait loci for self-pollination and seed dormancy in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 111: 619–629. doi: 10.1007/s00122-005-1934-7.
- Garello, G., P. Barthe, M. Bonelli, J. Bianco-Trinchant, J. Bianco, et al. 2000. Abscisic acid-regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *Helianthus annuus*: Role of ABA-inducible proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 473–482. doi: 10.1016/s0981-9428(00)00770-1.
- Gay, G., F. Corbineau, y D. Côme. 1991. Effects of temperature and oxygen on seed germination and seedling growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Environ. Exp. Bot.* 31: 193–200.
- Golabadi, M., P. Golkar, y M.R. Shahsavari. 2015. Genetic analysis of agromorphological traits in promising hybrids of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta Agric. Slov.* 105: 249–260. doi: 10.14720/aas.2015.105.2.08.
- Graeber, K., K. Nakabayashi, E. Miatton, G. Leubner-Metzger, y W.J.J. Soppe. 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant. Cell Environ.* 35: 1769–86. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02542.x.

- Grappin, P., D. Bouinot, B. Sotta, E. Miginiac, y M. Jullien. 2000. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* 210: 279–285. doi: 10.1007/pl00008135.
- Gross, B.L., y K.M. Olsen. 2010. Genetic perspectives on crop domestication. *Trends Plant Sci.* 15: 529–537. doi: 10.1016/j.tplants.2010.05.008.
- Hall, A.J. 2001. 15e Conference Internationale Tournesol Sunflower ecophysiology: some unresolved issues. *Oilseeds Fats, Crop. Lipids* 8: 15–21.
- Hammer, K. 1984. Das Domestikationssyndrom. *Kulturpflanze* 32: 11–34. doi: 10.1007/bf02098682.
- Harter, A. V, K.A. Gardner, D. Falush, D.L. Lentz, R.A. Bye, et al. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature* 430: 201–205. doi: 10.1038/nature02710.
- Heiser, C.B. 1951. The sunflower among North American Indians. *Proc. Am. Philos. Soc.* 95: 432–448.
- Heiser, C.B. 1976. The sunflower. Univ. Oklahoma Press. Norman.
- Heiser, C.B. 1988. Aspects of unconscious selection and the evolution of domesticated plants. *Euphytica* 37: 77–81. doi: 10.1007/bf00037227.
- Heiser, C.B., D.M. Smith, S.B. Clevenger, y W.C. Martin. 1969. The north american sunflowers (*Helianthus*). *Mem. Torrey Bot. Club* 22: 1–218.
- Heydecker, W., y R.S. Chetram. 1971. Water relations of beetroot seed germination. I. Microbial factors, with special reference to laboratory germination. *Ann. Bot.* 35: 17–29.
- Hills, P.N., y J. van Staden. 2003. Thermoinhibition of seed germination. *South African J. Bot.* 69: 455–461. doi: 10.1016/s0254-6299(15)30281-7.
- Hoang, H.H., C. Bailly, F. Corbineau, y J. Leymarie. 2013. Induction of secondary dormancy by hypoxia in barley grains and its hormonal regulation. *J. Exp. Bot.* 64: 2017–2025. doi: 10.1093/jxb/ert062.
- Hoang, H.H., J. Sechet, C. Bailly, J. Leymarie, y F. Corbineau. 2014. Inhibition of germination of dormant barley (*Hordeum vulgare* L.) grains by blue light as related to oxygen and hormonal regulation. *Plant, Cell Environ.* 37: 1393–1403. doi: 10.1111/pce.12239.
- Holdsworth, M.J., L. Bentsink, y W.J.J. Soppe. 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol.* 179: 33–54.
- Holman, T.J., P.D. Jones, L. Russell, A. Medhurst, S. Ubeda Tomás, et al. 2009. The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 4549–4554. doi: 10.1073/pnas.0810280106.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Karam, F., R. Lahoud, R. Masaad, R. Kabalan, J. Breidi, et al. 2007. Evapotranspiration, seed yield and water use efficiency of drip irrigated sunflower under full and deficit irrigation conditions. *Agric. Water Manag.* 90: 213–223. doi: 10.1016/j.agwat.2007.03.009.
- Karssen, C.M., D.L.C. Brinkhorst-Van der Swan, A.E. Breekland, y M. Koorneef. 1983. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Planta* 157: 158–165.
- Kermode, A.R. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *J. Plant Growth Regul.* 24: 319–344. doi: 10.1007/s00344-005-0110-2.

- Kilian, B., H. Özkan, C. Pozzi, y F. Salamini. 2009. Domestication of the *Triticeae* in the fertile crescent. En: Feuillet, C. y Muehlbauer, G.J., eds., Genetics and genomics of the *Triticeae*. Plant genetics and genomics: Crops and models 7. Springer Science+Business Media, LLC, New York. p. 81–119.
- Krochko, J.E., G.D. Abrams, M.K. Loewen, S.R. Abrams, y A.J. Cutler. 1998. (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiol.* 118: 849–860.
- Kucera, B., M.A. Cohn, y G. Leubner-Metzger. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281–307. doi: 10.1079/ssr2005218.
- Kutschera, U. 2002. Bacterial colonization of sunflower cotyledons during seed germination. *J. Appl. Bot. Bot.* 76: 96–98.
- Le Page-Degivry, M.T., P. Barthe, y G. Garello. 1990. Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus* embryo dormancy. *Plant Physiol.* 92: 1164–1168.
- Le Page-Degivry, M.T., J. Bianco, P. Barthe, y G. Garello. 1996. Changes in hormone sensitivity in relation to onset and breaking of sunflower embryo dormancy. En: Lang, G.A., ed., Plant dormancy. Physiology, biochemistry and molecular biology. CAB International. p. 221–231.
- Le Page-Degivry, M.T., y G. Garello. 1992. In situ abscisic acid synthesis. *Plant Physiol.* 98: 1386–1390. doi: 10.1104/pp.98.4.1386.
- Lenoir, C., F. Corbineau, y D. Côme. 1986. Barley (*Hordeum vulgare*) seed dormancy as related to glumella characteristics. *Physiol. Plant.* 68: 301–307.
- Lindström, L.I., C.N. Pellegrini, y L.F. Hernández. 2000. Anatomía y desarrollo del pericarpio de distintos genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L.). Proc. 15th Int. Sunflower Conf. Toulouse, Fr. June 12-15: D13–D18.
- Lindström, L.I., C.N. Pellegrini, y L.F. Hernández. 2007. Histological development of the sunflower fruit pericarp as affected by pre- and early post-anthesis canopy shading. *F. Crop. Res.* 103: 229–238. doi: 10.1016/j.fcr.2007.06.005.
- Lister, M.W. 1956. Descomposition of sodium hypochlorite: the uncatalyzed reaction. *Can. J. Chem.* 34: 465–478.
- Liu, Y., N. Ye, R. Liu, M. Chen, y J. Zhang. 2010. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *J. Exp. Bot.* 61: 2979–2990. doi: 10.1093/jxb/erq125.
- Maiti, R.K., P. Vidyasagar, S.C. Shahapur, y G.J. Seiler. 2006. Studies on genotypic variability and seed dormancy in sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.). *Indian J. Crop Sci.* 1: 84–87.
- Marchetti, R.C. 2012. Evaluation of four treatments to break seed dormancy of sunflower inbreds. Master of Science in Agriculture and Natural Resources. University of Tennessee at Martin.
- Matilla, A.J., y M.A. Matilla-Vázquez. 2008. Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Sci.* 175: 87–97. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.01.014.
- Mendiondo, G.M., D.J. Gibbs, M. Szurman-Zubrzycka, A. Korn, J. Marquez, et al. 2016. Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase *PROTEOLYSIS6*. *Plant Biotechnol. J.* 14: 40–50. doi: 10.1111/pbi.12334.
- Mendiondo, G.M., J. Leymarie, J.M. Farrant, F. Corbineau, y R.L. Benech-Arnold. 2010. Differential expression of abscisic acid metabolism and signalling genes induced by seed-covering structures or hypoxia in barley (*Hordeum vulgare* L.) grains. *Seed Sci. Res.* 20: 69–77. doi: 10.1017/s0960258509990262.

- Meyer, R.S., y M.D. Purugganan. 2013. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nat. Rev. Genet.* 14: 840–852. doi: 10.1038/nrg3605.
- Millar, A.A., J.V. Jacobsen, J.J. Ross, C.A. Helliwell, A.T. Poole, et al. 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J.* 45: 942–54. doi: 10.1111/j.1365-313x.2006.02659.x.
- Moreno, M.V., V. Nishinakamasu, M.A. Loray, D. Alvarez, J. Gioco, et al. 2013. Genetic characterization of sunflower breeding resources from Argentina: assessing diversity in key open-pollinated and composite populations. *Plant Genet. Resour.* 11: 238–249. doi: 10.1017/s1479262113000075.
- Motulsky, H.J. 2003. *GraphPad Prism 4.0 Statistics Guide-Statistical Analyses for Laboratory and Clinical Researchers.* GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA.
- Nambara, E., y A. Marion-Poll. 2003. ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* 8: 213–217. doi: 10.1016/s1360-1385(03)00060-8.
- Nasreen, S., M.A. Khan, M. Zia, M. Ishaque, S. Uddin, et al. 2015. Response of sunflower to various pre-germination techniques for breaking seed dormancy. *Pakistan J. Bot.* 47: 413–416.
- Née, G., Y. Xiang, y W.J. Soppe. 2017. The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 35: 8–14. doi: 10.1016/j.pbi.2016.09.002.
- Nelson, E.B., P. Simoneau, M. Barret, B. Mitter, y S. Compant. 2018. Editorial special issue: the soil, the seed, the microbes and the plant. *Plant Soil* 422: 1–5. doi: 10.1007/s11104-018-3576-y.
- Olsen, K.M., y J.F. Wendel. 2013. A bountiful harvest: genomic insights into crop domestication phenotypes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 47–70. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120048.
- Oracz, K., H. El-Maarouf-Bouteau, R. Bogatek, F. Corbineau, y C. Bailly. 2008. Release of sunflower seed dormancy by cyanide: cross-talk with ethylene signalling pathway. *J. Exp. Bot.* 59: 2241–2251. doi: 10.1093/jxb/ern089.
- Paniego, N., R. Heinz, P. Fernandez, P. Talia, V. Nishinakamasu, et al. 2007. Sunflower: oilseeds. En: Kole, C., ed., *Genome mapping and molecular breeding in plants.* Springer-Verlag, Berlin, Germany. p. 153–177.
- Paparella, S., S.S. Araújo, G. Rossi, M. Wijayasinghe, D. Carbonera, et al. 2015. Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Rep.* 34: 1281–1293. doi: 10.1007/s00299-015-1784-y.
- Preston-Mafham, J., L. Boddy, y P.F. Randerson. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 1–14. doi: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00990.x.
- Price, T.D. 2009. Ancient farming in eastern North America. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 6427–6428. doi: 10.1073/pnas.0902617106.
- Purwati, R.D., y A. Herwati. 2016. Short communication: evaluation of quantitative and qualitative morphological characters of sunflower (*Helianthus annuus*) germplasm. *Biodiversitas* 17: 461–465. doi: 10.13057/biodiv/d170209.
- Pustovoit, V.S. 1975. *The sunflower.* (In Russian.) Kolos Press, Moscow.
- Quarrie, S.A., P.N. Whitford, N.E.J. Appleford, T.L. Wang, S.K. Cook, et al. 1988. A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 173: 330–339. doi: 10.1007/bf00401020.

- Razi, H., y M.T. Assad. 1999. Comparison of selection criteria in normal and limited irrigation in sunflower. *Euphytica* 105: 83–90. doi: 10.1023/a:1003472212917.
- Reuzeau, C., y G. Cavalié. 1997. Changes in RNA and protein metabolism associated with alterations in the germination efficiency of sunflower seeds. *Ann. Bot.* 80: 131–137. doi: 10.1006/anbo.1997.0413.
- Rodríguez, M.V., P.E. Toorop, y R.L. Benech-Arnold. 2011. Challenges facing seed banks and agriculture in relation to seed quality. En: Kermodé, A.R., ed., *Seed dormancy: Methods in molecular biology*. Humana Press, New York, USA. p. 17–40.
- Rolletschek, H., L. Borisjuk, A. Sánchez-García, C. Gotor, L.C. Romero, et al. 2007. Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. *J. Exp. Bot.* 58: 3171–3181. doi: 10.1093/jxb/erm154.
- Roselló, P.L., A.E. Vigliocco, A.M. Andrade, N.V. Riera, M. Calafat, et al. 2016. Differential hormonal and gene expression dynamics in two inbred sunflower lines with contrasting dormancy level. *Plant Physiol. Biochem.* 102: 133–140. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.02.021.
- Schauer, S., y U. Kutschera. 2008. Methylophilic bacteria on the surfaces of field-grown sunflower plants: a biogeographic perspective. *Theory Biosci.* 127: 23–29. doi: 10.1007/s12064-007-0020-x.
- Seiler, G.J. 1992. Utilization of wild sunflower species for the improvement of cultivated sunflower. *F. Crop. Res.* 30: 195–230. doi: 10.1016/0378-4290(92)90002-q.
- Seiler, G.J. 1997. Anatomy and morphology of sunflower. En: Schneiter, A.A., ed., *Sunflower technology and production*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA. p. 67–111.
- Smith, B.D. 2006. Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 12223–12228. doi: 10.1073/pnas.0604335103.
- Snow, A.A., P. Moran-Palma, L.H. Rieseberg, A. Wszelaki, y G.J. Seiler. 1998. Fecundity, phenology, and seed dormancy of F1 wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Am. J. Bot.* 85: 794–801. doi: 10.2307/2446414.
- Sperber, K., T. Steinbrecher, K. Graeber, G. Scherer, S. Clausing, et al. 2017. Fruit fracture biomechanics and the release of *Lepidium didymum* pericarp-imposed mechanical dormancy by fungi. *Nat. Commun.* 8: 1868. doi: 10.1038/s41467-017-02051-9.
- Steinbach, H.S., R.L. Benech-Arnold, G. Kristof, R.A. Sánchez, y S. Marcucci-Poltri. 1995. Physiological basis of pre-harvest sprouting resistance in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. ABA levels and sensitivity in developing embryos of sprouting-resistant and -susceptible varieties. *J. Exp. Bot.* 46: 701–709. doi: 10.1093/jxb/46.6.701.
- Subrahmanyam, S.V.R., S.S.R. Kumar, y A.R.G. Ranganatha. 2002. Genotypic differences for seed dormancy in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Seed Res.* (New Delhi). 30: 325–327.
- Szemruch, C.L., S.J. Renteria, F. Moreira, M.A. Cantamutto, L. Ferrari, et al. 2014. Germination, vigour and dormancy of sunflower seeds following chemical desiccation of female plants. *Seed Sci. Technol.* 42: 454–460. doi: 10.15258/sst.2014.42.3.12.

- Truyens, S., N. Weyens, A. Cuypers, y J. Vangronsveld. 2014. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ. Microbiol. Rep.* 7: 40–50. doi: 10.1111/1758-2229.12181.
- van der Merwe, R., M.T. Labuschagne, L. Herselman, y A. Hugo. 2013. Stability of seed oil quality traits in high and mid-oleic acid sunflower hybrids. *Euphytica* 193: 157–168. doi: 10.1007/s10681-013-0888-0.
- Vaughan, D.A., E. Balázs, y J.S. Heslop-Harrison. 2007. From crop domestication to super-domestication. *Ann. Bot.* 100: 893–901. doi: 10.1093/aob/mcm224.
- Vear, F. 2016. Changes in sunflower breeding over the last fifty years. *OCL* 23: D202. doi: 10.1051/ocl/2016006.
- Vigliocco, A.E., A.M. Andrade, L.I. Lindström, y S.G. Alemanno. 2017. Dormancy in sunflower line A-3: The role of the pericarp. *Botany* 95: 853–858. doi: 10.1139/cjb-2016-0272.
- Viswanathan, R. 1996. Seed mycoflora composition in sunflower. *Indian Phytopathol.* 49: 286–289.
- Wang, M., R.M. van der Meulen, K. Visser, H.-P. Van Schaik, B. Van Duijn, et al. 1998. Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. *Seed Sci. Res.* 8: 129–137. doi: 10.1017/s0960258500004025.
- Wills, D.M., y J.M. Burke. 2007. Quantitative trait locus analysis of the early domestication of sunflower. *Genetics* 176: 2589–2599. doi: 10.1534/genetics.107.075333.
- Yamazaki, H., T. Nishijima, Y. Yamato, M. Koshioka, y H. Miura. 1999. Involvement of abscisic acid (ABA) in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki I. Endogenous levels of ABA in relation to bulb dormancy and effects of exogenous ABA and fluridone. *Plant Growth Regul.* 29: 189–194.