

**Dormición en frutos de girasol (*Helianthus annuus L.*): variabilidad intraespecífica y
mecanismos fisiológicos.**

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

Gonzalo Joaquín Arata

Ingeniero Agrónomo – FAUBA - 2015

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

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



COMITÉ CONSEJERO

Directora

María Verónica Rodríguez

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Co-director

Diego Batlla

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

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

Consejero

Roberto Benech-Arnold

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Doctor of Philosophy (University of Southampton)

JURADO DE TESIS

María Verónica Rodríguez

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Alejandro Presotto

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Sur, Argentina)

Magíster en Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Sur, Argentina)

Doctor en Agronomía (Universidad Nacional del Sur, Argentina)

José María Barrero Sánchez

Bachiller en Biología (Universidad de Alicante, España)

Magíster en Genética de Plantas (Universidad de Miguel Hernandez, España)

Doctor en Genética de Plantas (Universidad de Miguel Hernandez, España)

Sergio Gabriel Alemano

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina)

Fecha de defensa: 16 de mayo de 2022

Dedicatoria

A mis padres, Gusti quien me transmitió esta profesión y a perseverar, a Tata que me enseñó este último tiempo a valorar lo esencial de la vida.

A mis hermanos, Agus, Luli y Benja que fueron, son y serán mi sostén.

A mi tía Poliya por la paciencia, enseñanzas, consejos.

A mis primos, tías y amigos de la vida.

A todos por el amor y la compañía.

“La alimentación es el derecho moral de todos los que nacen en este mundo”.

Norman Borlaug.

Agradecimientos.

A mis directores de tesis, Vero y Diego, por su enseñanza y guía, y principalmente por la calidad humana. Por la paciencia y dedicación a la hora de transmitir y debatir ideas, darme lugar y tratarme como a un par. A Mai, compañera de estudios, carrera, ensayos (muchos), mates, risas, angustias; mi amiga, “La Tia”.

A Roberto por participar como consejero de esta tesis, por permitirme ser parte del grupo de investigación de semillas y de la Cátedra de Cultivos Industriales.

A Flor por su paciencia, enseñanza y compañía, a su Familia.

A Deborah Rondanini, mi directora de grado, con quien di mis primeros pasos en este ámbito.

A la UNICEN quienes me permitieron participar de mis primeras prácticas experimentales.

A mis compañeros y amigos de la Cátedra de Cultivos Industriales (Cris, Honduras, Kike, Kelly, Ro, Coni, Marianne, Magui, Nati, Luciana, Maxi, Toni, Fer), de Cerealicultura y Producción Vegetal (Roti, Victor, Nico, Beche, Gina, Sebas, Gonza, Santi).

Al equipo docente de las Cátedras de Cultivos Industriales y Cerealicultura por enseñarme la compleja tarea docente, y más importante aún, sus consejos y charlas.

A los técnicos y amigos del Campito de la Cátedra de Cerealicultura, Maxi “La Fiera” y Juancito. A los técnicos de IFEVA por su colaboración y predisposición en los ensayos y mediciones: Piti Tinaro, Silvi Enciso, Pato Demkura y Cris Escudero.

A Anita Mantese de la Catedra de Botánica de FAUBA por realizar las determinaciones histológicas de los pericarpios, su predisposición y tiempo a la hora de realizar consultas.

A Mirta Denkovski, secretaria de la Catedra por atender cálidamente siempre a mis consultas.

A Daniel Álvarez y Julio González por proveernos las líneas endocriadas, a Alejandro Presotto y Miguel Cantamutto por las poblaciones silvestres y a Ayerza semillas SA por la variedad GOR.

A Natalia Izquierdo por la gentileza de realizar las mediciones de contenido de aceite.

A los tesisistas de grado por su colaboración, predisposición y dedicación: Esteban López, Cande Figoli, Mavi Rambaud y Segundo Rosina.

A CONICET por financiar mi doctorado a través de la Beca, a IFEVA, las Cátedras de Cultivos Industriales y Cerealicultura de la FAUBA por haberme otorgado un espacio para realizar mis experimentos.

A la Escuela para Graduados y a los jurados de esta tesis por sus valiosos aportes.

A todos aquellos que fueron parte de este camino...

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.

Gonzalo Joaquín Arata.

Publicaciones derivadas de esta Tesis:

- **Arata, G.J.**, Riveira-Rubin, M.A., Batlla, D. and Rodríguez, M.V. (2021), Dormancy attributes in Sunflower achenes (*Helianthus Annuus* L.): I. Intraspecific variability. Crop Science. First published, 2 August 2021. <https://doi.org/10.1002/csc2.20610>
- Riveira-Rubin, M., **Arata, G.J.**, López, E.D., Rodriguez, V. and Batlla, D. (2021), Dormancy attributes in sunflower achenes (*Helianthus annuus* L.): II. Sowing date effects. Crop Science. First published, 2 August 2021. <https://doi.org/10.1002/csc2.20612>

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	VIII
INDICE DE CUADROS	XII
INDICE DE FIGURAS	XIV
ABREVIATURAS	XXI
RESUMEN	XXIV
ABSTRACT	XXVI
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL A LA PROBLEMÁTICA DE LA DORMICIÓN EN GIRASOL.....	1
1.1. Introducción general.....	1
1.1.1. Componentes estructurales de la Dormición	3
1.1.2. Concepto de nivel de dormición y rango térmico de incubación	5
1.1.3. Control fisiológico de la dormición del akenio, regulación hormonal y su interacción con las cubiertas.	7
1.1.4. Herencia de la dormición en el fruto de girasol	10
1.1.5. Efecto de las condiciones de almacenaje sobre la salida de dormición.....	12
1.2. Objetivo e hipótesis de trabajo	14
1.3. Estructura de la tesis	18
CAPÍTULO 2:	20
VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA DE LA DORMICIÓN: ESTUDIO DE ATRIBUTOS FENOTÍPICOS Y MECANISMOS FISIOLÓGICOS ASOCIADOS.	20
Resumen	20
2.1. Introducción.....	21
2.2. Materiales y métodos.....	23
2.2.1. Material vegetal y experimentos a campo	23
2.2.2. Pruebas de germinación.	28
2.2.3. Análisis estadístico	29
2.2.3.1. Variables de estudio	29
2.2.3.2. Análisis multivariado de los datos de germinación.....	30

2.2.3.3.	<i>Desarrollo y validación de modelos de germinación</i>	30
2.2.3.4.	<i>Análisis de regresión lineal y correlación</i>	32
2.3.	Resultados	32
2.3.1.	<i>Fenología y ambiente explorado durante el desarrollo y maduración de los frutos.</i>	32
2.3.2.	<i>Análisis multivariado para los atributos de dormición.</i>	33
2.3.2.1.	<i>Experimento 1</i>	33
2.3.2.2.	<i>Experimento 2</i>	37
2.3.3.	<i>Modelos de germinación en genotipos representativos de los grupos de dormición.</i> ...	43
2.4.3.	<i>Asociación entre la respuesta de la semilla al ABA con la DEBT y la TI en diferentes genotipos.</i>	46
2.4.	Discusión.....	48
2.5.	Conclusiones	54
CAPÍTULO 3:.....		55
HERENCIA DE LA DORMICIÓN Y TERMO-INHIBICIÓN EN AQUENIOS HÍBRIDOS DE GIRASOL. ESTUDIO DEL ROL DE LAS CUBIERTAS Y DEL CIGOTO EN ESTAS RESPUESTAS.....		55
Resumen.....		55
3.1.	Introducción	57
3.2.	Materiales y métodos	62
3.2.1.	<i>Cultivo de parentales contrastantes y realización de cruzamientos recíprocos</i>	62
Imagen 3. 1. Labores culturales en el cultivo luego de la siembra manual de los parentales: (A) Protección química contra enfermedades y plagas, (B) Retiro manual de las malezas a través de zapín en el surco y/o rastra manual en el entresurco. También se siguió la evolución fenológica en cada individuo periódicamente desde R1-estrella visible- hasta R5.9 -90% de flores en antesis (C, D).		
3.2.2.	<i>Ensayos de germinación</i>	65
3.2.3.	<i>Determinación de ABA endógeno por radioinmunoanálisis</i>	66
3.2.4.	<i>Evaluación de la sensibilidad a hipoxia durante la incubación</i>	67
3.2.5.	<i>Caracterización anatómica y determinaciones sobre componentes morfológicos del aquenio</i> 68	
3.2.6.	<i>Análisis estadístico</i>	69
3.3.	Resultados	70
3.3.1.	<i>Ambiente explorado por parentales e híbridos durante el desarrollo de los aquenios</i> .70	
3.3.2.	<i>Caracterización de la dinámica de salida de la dormición (SD) en los parentales (experimento 4)</i>	70
3.3.3.	<i>Germinación de los sistemas de cruzas a cosecha y durante la postcosecha</i>	72
3.3.3.1.	<i>Sistema de cruzas 1579:609</i>	72

3.3.3.2.	<i>Sistema de cruzas HA342:609 y B123:609</i>	73
3.3.4.	<i>Evaluación de la sensibilidad de los embriones al ABA en los sistemas de cruzas.</i>	76
3.3.5.	<i>Respuesta de los aquenios al agregado de GA y etefón en los sistemas de cruzas.</i>	79
3.3.6.	<i>Evaluación del rol de las hormonas ABA, etileno y GA en la expresión de la dormición, y regulación de estas vías hormonales por la hipoxia</i>	80
3.3.6.1.	<i>Niveles endógenos de ABA y su relación con el nivel de dormición</i>	81
3.3.6.2.	<i>Respuestas a inhibidores de síntesis, catabolismo y agentes oxidantes en los parentales</i>	83
3.3.6.3.	<i>Reversión del efecto del ABA por etefón en embriones y aquenios</i>	84
3.3.6.4.	<i>Asociación de la TI con la sensibilidad al ABA y a la hipoxia.</i>	86
3.3.7.	<i>Estructura de los aquenios y pericarpios. Mediciones morfológicas y cortes histológicos</i>	89
3.3.8.	<i>Asociación entre variables de dormición, características morfológicas del aquenio y anatomía del pericarpio</i>	93
3.3.9.	<i>Evaluación de la dormición durante el desarrollo de los aquenios: respuesta germinativa en agua, hormonas, hipoxia y niveles endógenos de ABA</i>	95
3.4.	Discusión	98
3.5.	Conclusiones.....	106
CAPÍTULO 4:		108
EFFECTO DEL AMBIENTE DE ALMACENAJE SOBRE LA POST-MADURACIÓN EN SECO DE LOS AQUENIOS.....		108
4.1.	Introducción.....	110
4.2.	Materiales y métodos.....	118
4.2.1.	<i>Material vegetal</i>	118
4.2.2.	<i>Aplicación de los tratamientos de almacenaje</i>	119
4.2.3.	<i>Monitoreo del contenido de humedad (CH) de los aquenios luego del almacenaje</i> ...	121
4.2.4.	<i>Evaluación del nivel de dormición: ensayos de germinación</i>	121
4.2.5.	<i>Determinación de ABA endógeno por radioinmunoanálisis</i>	122
4.2.6.	<i>Determinación del consumo de oxígeno (O₂) durante el almacenaje</i>	123
4.2.7.	<i>Análisis de peroxidación de lípidos (TBARS) en ejes embrionarios provenientes de distintas condiciones de almacenaje</i>	123
4.2.8.	<i>Análisis de conductividad eléctrica (CE) en semillas</i>	124
4.2.9.	<i>Dormición persistente vs. pérdida de vigor a los 7 meses: Respuesta de aquenios no germinadas a etefón; evaluación del vigor mediante peso fresco de plántulas</i>	124
4.2.10.	<i>Construcción de isotermas de sorción para aquenios del genotipo 600. Uso de estas para estimar la HRe y valores de ψ_w para aquenios almacenados bajo distintas condiciones</i>	125
4.2.11.	<i>Análisis estadístico</i>	126
4.3.	Resultados.....	127
4.3.1.	<i>Contenido hídrico de los aquenios durante el almacenaje</i>	127

4.3.2.	<i>Efectos del CH, la temperatura y el tiempo de almacenaje sobre la germinación de aquenios y embriones.</i>	130
4.3.2.1.	<i>Resultados del Experimento 6 - genotipo 600.</i>	130
4.3.2.2.	<i>Resultados para el Experimento 6 - genotipo 1579.</i>	135
4.3.2.3.	<i>Resultados para los Experimentos 7 y 8 – genotipo 600. Tasas de SD</i>	137
4.3.3.	<i>Capacidad germinativa de embriones en ABA y contenido endógeno de ABA en ejes embrionarios de aquenios almacenados bajo distintas condiciones de CH y TA</i>	141
4.3.4.	<i>Consumo de oxígeno durante el almacenaje</i>	142
4.3.5.	<i>Evaluación de la SD bajo ausencia de O₂ en el almacenaje (anoxia impuesta por saturación con N₂)</i>	144
4.3.6.	<i>Indicadores de deterioro en los diferentes tratamientos de almacenaje: evaluación de tratamientos de almacenaje luego de 7 meses</i>	146
4.3.7.	<i>Ensayos de reversión del CH durante el almacenaje</i>	151
4.3.8.	<i>Desarrollo de un modelo para la tasa de SD de los aquenios en función de la humedad relativa de equilibrio y/o potencial agua de almacenaje. Relación con los modelos de deterioro de Ellis y Roberts</i>	155
4.4.	Discusión.....	157
4.5.	Conclusiones	170
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GENERAL.....		172
Resumen.....		172
5.1.	Marco conceptual de la problemática de dormición en girasol.....	172
5.2.	Modelo de respuesta de la dormición en base a las hipótesis planteadas en el Capítulo 1 y resultados obtenidos en los Capítulos subsiguientes (2, 3 y 4): integración de las contribuciones al estado de conocimiento.....	173
5.3.	Aplicaciones desde el punto de vista agronómico de los resultados obtenidos.	185
5.4.	Implicancias para futuras investigaciones.....	188
BIBLIOGRAFIA		192
ANEXO		204

INDICE DE CUADROS

<p>Cuadro 2. 1. Resumen de los genotipos de girasol utilizados en este trabajo. Las columnas (de izquierda a derecha) indican el nombre del genotipo; la estación de crecimiento (verano 2015/2016, 2016/2017) y el número de experimento (1-3); el peso seco unitario de los aquenios; el contenido de aceite (%) medido por NIR; la fuente/origen de los genotipos (en los casos donde estuvieron disponibles, se indica el número de accesión según el GRIN de USDA). Se indica con números en superíndice quienes suministraron los genotipos: ¹Alejandro Presotto, UNS. ²Julio González, INTA Pergamino. ³Daniel Álvarez, INTA Manfredi, ⁴Ayerza Semillas S.A.</p>	26
<p>Cuadro 2. 2. Parámetros calculados de los modelos (Fig. 2.9 y 2.10) para tres genotipos del experimento 1 (AAL, 1579 y 609) para dos niveles de dormición (alto – 0 o 30 DDC- y bajo – 90 o 150 DDC-). Temperatura base para la germinación de aquenios (T_b), tiempo térmico para la germinación (TT) y su desviación estándar (σ_{TT}), temperatura media del límite inferior [$T_i(50)$] y su desviación estándar (σ_{Ti}), temperatura media del límite superior [$T_s(50)$] y su desviación estándar (σ_{Ts}), raíz del error cuadrático medio (RECM) para la germinación de aquenios (G.) y para la temperatura límite inferior/superior (T_i y $T_s(50)$), y finalmente los coeficientes de determinación (R^2) para cada temperatura de incubación (10, 15, 20, 25, 30°C) y del modelo general.</p>	44
<p>Cuadro 3. 1. Tiempo en alcanzar el 50% de germinación durante el almacenaje postcosecha (T_{50}) en los parentales e híbridos en las distintas estructuras (aquenio, semilla, embrión) a 30 y 10°C de incubación. Las dinámicas se calcularon por extrapolación lineal en las dinámicas de la Fig. 3.3... 72</p> <p>Cuadro 3. 2. Germinación final de aquenios y embriones a trinexapac-etil en 250 μM (Trin) y peróxido de hidrogeno 200 μM (H_2O_2) en parentales (609, 1579 y HA342) incubados a 30 y 10°C al momento de cosecha (0 DDC). Los datos corresponden al experimento 4 y cada punto representa la media \pm su desvío estándar ($n=3$). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$), la prueba de medias corresponde a una temperatura de incubación y estructura del fruto.</p>	83
<p>Cuadro 3. 3. Germinación final de aquenios en agua (H_2O), cloruro de cobalto (CoCl_2) 1 mM y Diniconazole 250 μM (Dini) en los tres parentales de estudio a 30 y 10°C, a cosecha (0 DDC) y 30 DDC. Los datos corresponden al experimento 5 y cada valor representa la media \pm su desvío estándar ($n=3$). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$), la prueba de medias corresponde a una temperatura de incubación y momento (cosecha y 30 DDC).....</p>	84
<p>Cuadro 3. 4. Mediciones sobre los cortes de pericarpios realizados en parentales (HA342, B123, 1579, 609) e híbridos (HA342x609, 609xHA342, 1579x609, 609x1579, B123x609, 609xB123). Se muestra el espesor total del pericarpio, espesor del parénquima medio en μm y la cantidad de capas de células del parénquima medio. Media \pm error estándar ($n=3$), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).....</p>	91
<p>Cuadro 3. 5. Características morfológicas de los aquenios en los parentales (HA342, B123, 1579, 609) e híbridos F1 (HA342x609, 609xHA342, B123x609, 609xB123, 1579x609, 609x1579). De izquierda a derecha, en las columnas se indica: el peso (expresado en mg, para 1000 unidades) de aquenio, de cáscara, pepita (semilla sin pericarpio), la relación peso de pericarpio/pepita y dimensiones del aquenio (largo, ancho, espesor). Las medias con una letra iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).....</p>	93

Cuadro 4. 1. Efecto de los cambios del CH (%) luego de un almacenaje prologado (16 meses) a 10 y 15°C. Se muestra la germinación de achenios a dos temperaturas de incubación (10, 25°C), almacenados a CH de 4% constantes durante 16 meses y luego, sobre una submuestra se modificó el CH de 4 a 6% (almacenado durante 40 días). Cada valor indica la media \pm EE (n=3).154

INDICE DE FIGURAS

- Fig 1. 1.** Esquema e imágenes de una disección longitudinal de un akenio de girasol, mostrando el pericarpio o cascara (Pe), cubierta seminal (CS), embrión (e) y su correspondiente eje (ej). Debajo se muestra un esquema e imagen de un corte de la región ecuatorial del pericarpio indicando la epidemis y la hipodermis (e+h), parénquima medio (PM), capas internas comprimidas (ci) y radios parenquimáticos (r). Esquema extraído de Lindstrom et al. (2007) e imágenes tomadas de esta tesis. 3
- Fig 1. 2.** Efecto de la temperatura de incubación sobre el porcentaje final de germinación **(A)** para akenios (1), semillas (2) y embriones (3) al momento de cosecha, y **(B)** en akenios de girasol recién cosechados (1) y almacenados en seco a 20°C durante un mes (2), 2 meses (3) y 6 meses (4) (Corbineau et al., 1990). 6
- Fig. 2. 1. (A)** Biplot correspondiente a los dos primeros CP de los 9 genotipos analizados en el experimento 1. Cada punto representa un genotipo: cultivado (grupo 1, círculos rojos), cultivado con TI (grupo 2, triángulo celeste) y *H. annuus silvestre* (grupo 3, cuadrados verdes). Los símbolos pequeños indican cada genotipo y los símbolos grandes marcan el centro de cada grupo. Los vectores desde el origen (flechas negras) representan las variables de estudio (ver sección Materiales y métodos). **(B)** Análisis de clúster. Dendograma obtenido a partir de los genotipos y variables analizadas en el biplot del experimento 1. Las líneas punteadas sobre el eje de distancia euclídea muestran los 3 grupos funcionales representados en el biplot. 34
- Fig. 2. 2.** Germinación final acumulada (%) durante distintos momentos después de la cosecha para distintas temperaturas de incubación (10 a 30°C). Los momentos postcosecha evaluados son 0 (barras blancas), 30 (barras celestes), 90 (barras azules) y 150 DDC (barras negras). Cada subfig. representa un genotipo. Los rectángulos con líneas punteadas negras representan el grupo al que pertenece cada genotipo según el AC del experimento 1. Cada barra representa la media \pm su EE (n=3). 35
- Fig. 2. 3.** Germinación final (%) en función de los DDC para akenios incubados a 25°C (líneas y círculos llenos rojos) y a 10°C (líneas y cuadrados llenos azules), y para embriones incubados a 25°C (línea punteada y círculos vacíos rosas) y a 10°C (línea punteada y cuadrados vacíos celestes). Cada subFig. representa un genotipo y los recuadros punteados representan los grupos obtenidos mediante el AC del experimento 1. Cada punto representa la media \pm su EE (n=3). 36
- Fig. 2. 4. (A)** Biplot correspondiente a los dos primeros componentes principales (CP) de los 16 genotipos cultivados analizados en el experimento 2. Cada punto representa un genotipo: nivel bajo (grupo 1, círculos rojos), nivel intermedio (grupo 2 y 3, triángulos celestes y cuadrados verdes respectivamente), nivel intermedio con TI (grupo 4, cruces violetas) y nivel alto de dormición (grupo 5, cuadrados abiertos y cruces naranjas). Los símbolos pequeños indican cada genotipo y los símbolos grandes marcan el centro de cada grupo. Los vectores desde el origen (flechas negras) representan las variables de estudio (ver la sección 2.2. Materiales y métodos). **(B)** Análisis de clúster. Dendograma obtenido a partir de 16 genotipos y las variables analizadas en el biplot. Se muestra un punto de corte sobre el eje de distancia euclídea, identificando los 5 grupos proyectados en el biplot. 38
- Fig. 2. 5.** Germinación final acumulada (%) durante la postcosecha para distintas temperaturas de incubación (10 a 30°C). Los momentos postcosecha evaluados son 0 (barras blancas), 30 (barras celestes), 60 (barras azules) y 90 DDC (barras negras). Cada subFig. representa un genotipo. Los rectángulos con líneas punteadas negras representan el grupo al que pertenece cada genotipo según el AC del experimento 2. Cada barra representa la media \pm su EE (n=3). 41

- Fig. 2. 6.** Germinación final (%) en función de los DDC para aquenios incubados a 25°C (líneas y círculos llenos rojos) y a 10°C (líneas y cuadrados llenos azules), y para embriones incubados a 25°C (línea punteada y círculos vacíos rosas) y a 10°C (línea punteada y cuadrados vacíos celestes). Cada Fig. representa un genotipo y los recuadros punteados los grupos obtenidos mediante el AC del experimento 2. Cada punto representa la media ± su EE (n=3).....42
- Fig. 2. 7.** Modelado de la fracción germinativa (línea llena) de la población de aquenios en el rango térmico de incubación para diferentes genotipos del experimento 1 (AAL, silvestre; 1579, cultivado con TI; 609, cultivado sin TI). Se ven representadas dos situaciones: niveles intermedios (0/30 DDC, líneas azules) y bajos de dormición (90/150 DDC, líneas rojas). Los valores de la temperatura media del límite inferior [Ti(50)] y la temperatura media del límite superior [Ts(50)] se muestran con líneas punteadas verticales y los desvíos estándar (σ) como la amplitud de la "campana" (curvas punteadas). El modelo se elaboró a partir de la metodología sugerida por Batlla y Benech-Arnold (2015), Washitani (1987).....43
- Fig. 2. 8.** Evolución del porcentaje acumulado de germinación de aquenios en función del tiempo de incubación (d) para tres genotipos del experimento 1 (AAL, 1579 y 609). Se muestra la germinación simulada (símbolos llenos) y observada (símbolos vacíos) para frutos incubados a 10, 15, 20, 25 y 30°C y presentando niveles contrastantes de dormición (niveles intermedios -cuadrados- y bajos -círculos-) asociados con diferentes tiempos de almacenaje (0 y 90 DDC para el 609, y 30 y 150 DDC para 1579 y AAL).....45
- Fig. 2. 9.** Respuesta a ABA exógeno para diferentes genotipos. AAL (silvestre, diamantes llenos), 1579 (cultivado con TI, círculos llenos), HA89 (cultivado, triángulos vacíos) y 600 (cultivado, cuadrados vacíos) del experimento 3 (ver dinámicas Fig. S. 2.2). Germinación de aquenios (fondo gris) y semillas en agua destilada, semillas en soluciones ABA 5 y 50 μ M (a 10 y 30°C) a cosecha (0 DDC) y en diferentes tiempos durante el almacenaje postcosecha (30, 60 y 90 DDC). Cada punto representa la media (n=3) ± su EE.....46
- Fig. 2. 10.** Asociación entre la germinación final de los aquenios y la germinación de semillas en ABA durante la cosecha y durante el almacenaje postcosecha, incubados a dos temperaturas (30 y 10°C; A y B, respectivamente). La incubación de las semillas corresponde a una solución de ABA con concentración 5 μ M. Los genotipos analizados fueron AAL (cuadrados llenos), 1579 (diamantes llenos), HA89 (círculos vacíos) y 600 (triángulos vacíos) del experimento 3. Cada punto representa la media (n=3) y se muestra el factor de determinación (R^2) y correlación de Pearson (r; $\alpha=0.05$). .47

Fig. 3. 1. Esquema simplificado de tipos de herencia que pueden presentar los aquenios (A, B, C, D, G): Dominancia por alelos de un parental sobre el otro (A, B), dominancia incompleta (C) y herencia materna (D). En esta última, los embriones aislados pueden presentar dos tipos de fenotipos, (E) donde ambas cruzas se asemejan al parental materno debido a herencia materna tipo citoplasmática o (F) que el comportamiento de los aquenios sea independiente al de los embriones (F). Finalmente se muestra un panel (G) con la dinámica de germinación de aquenios enteros durante la post-cosecha: genotipos de baja (A), alta dormición (B) y termo-inhibición (C) -en líneas llenas-. En caso de observarse dominancia completa ambas cruzas se comportarían como uno de los parentales. Alternativamente en presencia de dominancia incompleta ambos híbridos serán idénticas e intermedias a los parentales (AxB, BxA) -líneas punteadas- y en caso de haber herencia materna, la craza se desplazaría hacia su parental materno (A y AxB, B y BxA). En caso de que la herencia materna se dé por efectos citoplasmáticos los embriones aislados de los híbridos deberían parecerse a su parental materno. En caso de que predomine una herencia materna asociada a las cubiertas (y no exclusivamente al embrión), los embriones deberían mostrar un fenotipo similar entre sí (pudiendo

- ser a la vez similar o intermedio a los parentales). Además, otro caso de presencia de termo-inhibición (herencia materna debido a cubiertas) y su expresión en el fenotipo de la cruce (CxA)..... 61
- Fig. 3. 2.** Evolución de la germinación final (%) durante la postcosecha (DDC) de los parentales 609 (círculos para dos fechas de floración 1 y 2), 1579 (cuadrados), HA342 (triángulos) y B123 (rombos). Se observa la germinación de aquenios, semillas y embriones (gráficos de izquierda a derecha) a dos temperaturas opuestas en el rango de incubación (10 y 30°C, panel superior e inferior respectivamente). Los datos corresponden al experimento 4 y cada punto representa la media \pm su EE (n=3). 71
- Fig. 3. 3.** Evolución de la germinación final (%) durante la postcosecha (DDC) de los parentales e híbridos recíprocos sobre aquenios, semillas y embriones (gráficos de izquierda a derecha) a dos temperaturas opuestas en el rango de incubación (10 y 30°C, panel superior e inferior respectivamente). Se muestran los tres sistemas de cruces (A, 1579:609; B, HA342:609; C, HA342:609). Los datos corresponden al experimento 4 y cada punto representa la media \pm E.E. (n=3). 74
- Fig. 3. 4.** Respuesta a ABA exógeno para los parentales y sus cruces recíprocas sobre los 3 sistemas de cruces (A, 1579:609; B, 1579:609; C, HA342:609). Germinación final de aquenios (sombra gris) y embriones en agua destilada, y de embriones en soluciones de ABA 5 y 50 μ M (a 30°C) y Fluridone + ABA 1, 5 μ M (a 10°C) a cosecha (0 DDC) y durante la postcosecha (30 y 75 DDC). Para los ensayos de cosecha y 30 DDC, las incubaciones en ABA se combinaron con Fluridone 100 μ M. A los 75 DDC las incubaciones en ABA no incluyeron Fluridone). Se muestran los tres sistemas de cruces (A, 1579:609; B, HA342:609; C, HA342:609). Los datos corresponden al experimento 4 y cada punto representa la media \pm su EE (n=3). 77
- Fig. 3. 5.** Respuesta a GA₃ y etefón exógeno en los parentales y sus cruces recíprocas sobre los 3 sistemas de cruces (A, 1579:609; B, 1579:609; C, HA342:609). Germinación de aquenios en agua destilada y soluciones de GA₃ 10 y 100 μ M y etefón 50 μ M, incubados a 30 y 10°C al momento de cosecha (0 DDC) y durante la postcosecha (30 y 75 DDC). Se muestran los tres sistemas de cruces (A, 1579:609; B, HA342:609; C, HA342:609). Los datos corresponden al experimento 4 y cada punto representa la media \pm su EE (n=3). 80
- Fig. 3. 6. (A)** Contenido endógeno de ABA en ejes embrionarios a cosecha (0 DDC, barras azules) y en la postcosecha (150 DDC, barras azules) en los parentales de los sistemas de cruces (609, 1579 y HA342). Los valores corresponden a los ejes de aquenios “secos” (Sc) e incubados 24 h en agua (H₂O), Fluridone 100 μ M (Flu) y etefón 50 μ M (Et) a 30°C. **(B)** Germinación final de aquenios de tres parentales, incubados en agua (barras celestes) y etefón 50 μ M (barras verdes) a 30°C, en los dos momentos donde se evaluaron los niveles endógenos de ABA (0 y 150 DDC). **(C)** Contenido endógeno de ABA en ejes embrionarios a cosecha (0 DDC: paneles 1, 3) y en la postcosecha (150 DDC: paneles 2, 4) en los parentales de los sistemas de cruces HA342:609 (1, 2) y 1579:609 (3,4). Los valores corresponden a los ejes de aquenios secos (-) e incubados 24 h en agua (+). En **A**, **B** y **C**, los datos corresponden al experimento 4 y cada barra muestra la media \pm su EE (n=3). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). 82
- Fig. 3. 7.** Respuesta a Fluridone, ABA, etefón y la combinación de Fluridone, ABA y etefón en los tres parentales utilizados: 609, 1579 y HA342. *Fila superior:* Germinación final de embriones en agua destilada (0, H₂O), soluciones con Fluridone (0) 100 μ M en combinaciones con ABA 5 y 50 μ M (5 y 50) junto a etefón 50 μ M (50+Et). *Fila inferior:* Germinación final de aquenios incubados en agua destilada (H₂O), ABA 50 μ M (0), etefón 50 μ M (Et) y ABA 50 μ M junto a etefón 50 μ M (+Et.50) y 250 μ M (+Et.250). Los ensayos de germinación se realizaron a cosecha (0 DDC) y diferentes

tiempos durante la postcosecha (30 y 75 DDC) a 30° de incubación. Los datos corresponden al *experimento 5* y cada punto representa la media \pm su EE (n=3).85

Fig. 3. 8. Germinación de aquenios (0, Aq.) y embriones en agua (0, Embrión) y embriones en ABA 0,5, (solo en el panel B) 5, 25 μ M bajo una atmosfera de hipoxia (3% O₂, cuadrados) y atmosfera normal (21% O₂, círculos) a 30° de incubación en los tres parentales del experimento 5 (609 -azul-, 1579 -verde-, HA342 -rojo-). Los paneles **A** y **B** muestran las respuestas en distintos momentos durante la postcosecha (40 y 100 DDC respectivamente). Cada punto indica la media \pm su EE (n=3). El panel **C** muestra la germinación de aquenios en agua (H₂O) y etefón 50 μ M (Et.) bajo una atmosfera de hipoxia (3% O₂, barras rayadas) y normoxia (21% O₂, barras lisas). Cada barra indica la media \pm su EE(n=3) y letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).....87

Fig. 3. 9. Germinación aquenios bajo una atmosfera de hipoxia (3% O₂, columnas a rayas) y atmosfera normal (21% O₂, columnas rellenas) en dos parentales (609, HA342) y sus respectivas cruza del experimento 4 (609xHA342, HA342x609) a 30° de incubación. Las determinaciones se realizaron a los 75 y 470 DDC. Los valores en porcentajes sobre las columnas indican los niveles de respuesta a la hipoxia con respecto a la atmosfera normal. Cada columna indica la media \pm su E.E. (75 DDC, n=3; 470 DDC, n=2) y letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)89

Fig. 3. 10. Biplot correspondiente a los dos primeros componentes principales (CP) de los parentales evaluados (609, 1579, HA342, B123) e híbridos recíprocos (609x1579, 609xHA342, 609xB123, 1579x609, HA342x609, B123x609) del experimento 4. Las variables incluidas fueron espesor del pericarpio (Esp.Per.), peso de mil de aquenios (P.Aq.), largo del aquenio (Largo), relación pericarpio-pepita (Per.:Pep), factor de termo-inhibición (FTI), respuesta de embriones al ABA a 30° y 10° (ABA.30, ABA.10), tiempo en alcanzar el 50% de germinación durante la postcosecha a 30° y 10° (T_{50.30}, T_{50.10}). Los genotipos se representan en puntos de colores según el parental y en las cruza representan al parental que se comportó como madre (609, rojo; 1579, gris; HA342, verde; B123, celeste). Las variables se representan mediante vectores negros.95

Fig. 3. 11. Evolución durante el desarrollo de los aquenios (en DDF o R5.5) del contenido endógeno de ABA en ejes embrionarios (panel A y B) y de la germinación a 30°C de embriones aislados (paneles C y D) en agua (símbolos y líneas llenas) y en ABA 5 μ M (símbolos vacíos y líneas punteadas; incluyendo Flurocloridona 10 μ M para reprimir la síntesis de novo en la incubación) en los parentales (609 -azul-, HA342 -rojo-, 1579 -verde-) de dos sistemas de cruza (HA342:609 y 1579:609). Los momentos de muestreo representan distintos momentos del desarrollo de los frutos: temprano (12-14 DDA y CH \approx 76%), más cercano a madurez fisiológica (26 DDA y CH \approx 54%) y madurez de cosecha (HA342, 1579, 609) luego del secado del fruto a CH de 6-7% (representado por el sombreado gris). Las flechas sobre el eje de las abscisas indican el momento en que se alcanzó la madurez fisiológica en cada parental. Los datos corresponden al experimento 4 y cada punto representa la media \pm su EE (n=3).97

Fig. 4. 1. (A) Relación entre el CH de las semillas y la HRe (denomina isoterma de sorción de humedad). Según el modelo D'Arcy-Watt de las isotermas de sorción, la curva completa (d) se compone de tres subcomponentes principales. Los sitios de unión fuerte (curva a), entre el 10 y el 80-90% de HR, la unión débil del agua (curva b) y con una HR alta (<80%), el CH aumenta de forma pronunciada a medida que aumenta la HR (curva c). La suma de las contribuciones de estos componentes da lugar a la isoterma de sorción observada (curva d). Factores que modifican las isotermas: (B) La composición química de la semilla. Relación entre el CH de la semilla y la HRe para semillas de varias especies con distinto contenido de aceite (arroz -2,2%-, sorgo -5%-, soja -

20%-, lechuga -37%-, maní -58%-, tejo-71%-). (C) Efecto de la temperatura. Relación entre el CH y la HRe para distintas temperaturas de almacenaje (5, 15, 25, 35, 45, 55°C). (D) Efecto de la histéresis. El fenómeno de pérdida de agua de la semilla (curva de desorción) difiere de la de ganancia (curva de absorción). Adaptado de Bewley et al. (2013)..... 115

Fig. 4. 2. Esquema de métodos utilizados para alcanzar los CH objetivo para cada uno de los experimentos (6, 7 y 8). Se observa que se parte de una muestra con un CH inicial (11-12%) al momento de cosecha. En el experimento 6 (genotipo 1579 y 600) se procedió a llevar a 6% en secadora, luego a 4% utilizando sílica gel (desorción), y a 8 y 10% a través de una cámara con HR 100% (adsorción). En el experimento 7 y 8 (genotipo 600) las muestras se obtuvieron a través de un secado progresivo utilizando secadora (10, 8 y 6%) y sílica (4%; desorción). 120

Fig. 4. 3. Contenido de humedad para los tratamientos de almacenaje. Las líneas punteadas horizontales representan el valor de CH objetivo (4, 6, 8 y 10%) y cada punto representa el valor logrado durante el almacenaje (media \pm EE; n=3). Sobre el eje de las abscisas se muestran las distintas TA (-18, 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) a las cuales fueron almacenadas cada una de los CH y tratamientos control: Sales saturadas (NaCl y K₂CO₃) y con nitrógeno (N₂). Se muestran 3 años de experimentos (6, 7 y 8) y distintos momentos durante el almacenaje (DDA) sobre distintos genotipos: Experimento 6, 600 y 1579; experimento 7 y 8, 600. Los valores p tanto para interacción y efectos principales se muestran en el Cuadro S. 4.1..... 129

Fig. 4. 4. Porcentaje final de germinación de aquenios (círculos y líneas llenas azules), embriones (cuadrados y líneas punteadas rojas) y embriones incubados en ABA 5 μ M (triángulos y líneas naranjas) en función de la TA (-18, 5, 10, 15, 20, 25, 30°C) para distintos CH de los aquenios (4 - A,I,E,M-, 6 -B,J,F,N-, 8 -C,K,G,O- y 10% -D,L,H,P-). Además, se muestran dos temperaturas de incubación (10° -E,F,G,H,M,N,O,P- y 30°C -A,B,C,D,I,J,K,L-) y dos momentos durante el almacenaje (30 -A:H- y 70 DDA-I:P-) en el genotipo 600 del experimento 6. Las líneas punteadas de intersección sobre el eje “y” representan la germinación de aquenios (líneas azules) y embriones (líneas rojas) antes del almacenaje para cada CH. Cada punto representa la media \pm EE (n=3). ... 132

Fig. 4. 5. Porcentaje final de germinación de aquenios (círculos y líneas llenas azules), embriones (cuadrados y líneas punteadas rojas) y embriones incubados en ABA 5 μ M (triángulos y líneas naranjas) en función de la TA (-18, 5, 10, 15, 20, 25°C) para distintos CH de los aquenios (CH 4% - A,I,E,M-, 6% -B,J,F,N-, 8% -C,K,G,O- y 10% -D,L,H,P-). Además, se muestran dos temperaturas de incubación (10°C -E,F,G,H,M,N,O,P- y 30°C -A,B,C,D,I,J,K,L-) y dos momentos durante el almacenaje (37 -A:H- y 77 DDA-I:P-) en el genotipo 1579 del experimento 6. Las líneas punteadas de intersección sobre el eje “y” representan la germinación de aquenios (líneas azules) y embriones (líneas rojas) antes del almacenaje para cada CH. Cada punto representa la media \pm EE (n=3). ... 136

Fig. 4. 6. Porcentaje final de germinación de aquenios (círculos y líneas llenas azules), embriones (cuadrados y líneas punteadas rojas) y embriones incubados en ABA 5 μ M (triángulos y líneas naranjas) en función de la TA (5, 10, 15, 20, 25°C) para distintos CH de los aquenios (4 -A,I,E,M-, 6 -B,J,F,N-, 8 -C,K,G,O- y 10% -D,L,H,P-). Además, se muestran dos temperaturas de incubación (10° -E,F,G,H,M,N,O,P- y 25°C -A,B,C,D,I,J,K,L-) y dos momentos durante el almacenaje (30 -A:H- y 70 DDA-I:P-) en el genotipo 600 del experimento 7. Las líneas punteadas de intersección sobre el eje “y” representan la germinación de aquenios (líneas azules) y embriones (líneas rojas) antes del almacenaje para cada CH. Cada punto representa la media \pm EE (n=3). 138

Fig. 4. 7. Porcentaje final de germinación de aquenios incubados a 10° (cuadrados y líneas azules) y 25° (círculos y líneas rojas) en función de la TA (-18, 5, 10, 15, 20, 25°C) para distintos CH de los aquenios (4 -A,E,I-, 6 -B,J,F-, 8 -C,K,G- y 10% -D,L,H-). Además, se muestran tres momentos

- durante el almacenaje (30 -A,B,C,D-, 60 -E,F,G,H- y 100 DDA -I,J,K,L-) en el **genotipo 600** del experimento 8. Cada punto representa la media \pm EE (n=3).**¡Error! Marcador no definido.**
- Fig. 4. 8.** Tasa de SD relativa (TSDR) de los akenios durante el almacenaje según la TA (5, 10, 15, 20, 25 y eventualmente -18, 30°C) y el CH (4 -A,E,I,M-, 6 -B,F,J,N-, 8 -C,G,K,O- y 10% -D,H,L,P-). Las líneas representan las temperaturas de incubación a 25/30°C (círculos llenos) y 10°C (cuadrados vacíos). Los datos muestran dos genotipos realizados durante el experimento 6 (600 -A:D- y 1579 -E:H-), 7 (600 -I,J,K,L-) y 8 (600 -M,N,O,P-). Cada punto representa el valor estimado corresponde a la germinación lograda por el 50% de la población de frutos, relativizado al tratamiento que arrojo el máximo valor.139
- Fig. 4. 9. A)** Porcentaje final de germinación (GF) de akenios incubados en agua destilada en función de la germinación final de embriones aislados incubados en ABA 5 μ M a 25°C, en dos momentos de almacenaje (30 y 70 DAS). **B)** Porcentaje final de germinación (GF) de akenios incubados en agua destilada a 25°C en función del contenido de ABA endógeno en ejes embrionarios disecados a los 70 DAS, tanto en akenios secos (símbolos llenos) e incubados 24h en agua (símbolos vacíos). Cada punto representa la media \pm E.E. del tratamiento combinado de CH (4, 6, 8, 10%) y TA (5, 15, 25°C) de los datos del genotipo 600 en el experimento 7. Se muestran el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el valor p.141
- Fig. 4. 10.** Mediciones de oxígeno relativo a la atmosfera normal (21%) en función de la TA, para cuatro CH de akenios (4% -círculos y líneas rojas-, 6% -cuadrados y líneas rosas-, 8% -triángulos y líneas celestes- y 10% -rombos y líneas azules-). Además, se muestran los controles de hipoxia (+N₂) con CH de 6 y 8% (cuadrados y círculos vacíos respectivamente) a 5 y 25°C. Las determinaciones se realizaron en dos genotipos (600 y 1579) del experimento 6, en dos momentos durante el almacenaje (30-37 y 70-77 DDA). Cada punto representa la media \pm E.S. (n=3). Las interacciones entre factores resultaron ser estadísticamente significativas (<0,0001***) para ambos tiempos y genotipos.143
- Fig. 4. 11.** Porcentaje final de germinación de akenios y embriones, en akenios almacenados en normoxia (21% O₂) y anoxia (\approx 100% N₂), con distintos CH (6 y 8%) y TA (5 y 25°C). Se muestran dos temperaturas de incubación (10 y 30°C) en los genotipos 600 y 1579 del experimento 6, a los 70 y 77 DDA respectivamente. Cada barra representa la media \pm EE (n=3).145
- Fig. 4. 12.** Pocentaje final de germinación de akenios, embriones en agua destilada y ABA 5 μ M, donde los akenios se almacenaron con distintos CH (4, 6, 8 y 10%) y dos TA (5 y 25°C), bajo condiciones de normoxia (21% O₂) y anoxia (100% N₂). Se muestran los resultados luego de 70 DDA bajo dos condiciones de incubación (10 y 25°C). Cada barra representa la media \pm EE (n=3). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre control y anoxia.146
- Fig. 4. 13.** Porcentaje final de germinación de akenios luego de 200 DDA en el genotipo 600 (experimento 6) para los tratamientos de almacenaje incubados en agua destilada a 10°C (E1, barras celestes). Germinación luego transferir akenios remanentes placas con etefón (E2, barras verdes). Los puntos muestran los valores de conductividad eléctrica (CE, en μ S/cm.g.) a los 70 DDA. Los resultados de ANOVA para CE no arrojaron interacción significativa entre factores, siendo el CH el que tuvo mayor significancia (p<0.001*** vs. TA p=0.012*).148
- Fig. 4. 14.** Peso fresco de plántulas (mg) en función de la TA (°C) en los 4 CH evaluados (representados en los recuadros) a los 200 DDA. Los asteriscos representan tratamientos que fueron transferidos a etefón (E2, luego de haber incubado en agua destilada-E1-) a 10°C, y las flechas representan aquellos con falta de germinación (o presencia de plántulas anormales). Las barras representan la media \pm su EE.149
- Fig. 4. 15.** Niveles de malondialdehído (mg MDA/ g ejes embrionarios) para tratamientos bajos distintos CH (4, 6, 8 y 10%) y TA (5-25°C) determinados a los 70 DDA en el genotipo 600 del

experimento 7. Cada barra representa la media \pm E.E. (n=3). Los resultados de ANOVA no arrojaron interacción significativa entre factores, siendo los efectos de ambos factores (CH y TA) significativos ($p < 0.001^{***}$). 150

Fig. 4. 16. Porcentaje final de germinación de aquenios incubados 10 y 25°C, almacenados a 20°C con distintos CH constantes (6, 8 y 10%). Las determinaciones se realizaron en distintos momentos comenzado el almacenaje (DDA). Avanzado el almacenaje (39 DDA), se muestran los tratamientos de reversión en los CH (6 a 10%, 8 a 6% y 10 a 6%), y su correspondiente porcentaje de germinación luego del cambio en el CH (39 DDA, indicado con flecha negra) y luego de un periodo de almacenaje (60 y 100 DDA). 152

Fig. 4. 17. Modelo de TSDR y la TDR para la combinatoria de tratamientos de CH y TA en el genotipo 600 del experimento 8, en función de la HRe (%), panel A) y ψ_w (MPa, panel B). Cada punto de TSDR representa el valor estimado a partir de los modelos de salida de la Fig. S 4.6. para 10° (cuadrados azules) y 25°C de incubación (círculos rojos). Los puntos negros indican los tratamientos de -18°C. Se muestra sobre algunos puntos una leyenda indicando la combinatoria de tratamientos (CH-TA). Las funciones exponenciales de TDR se muestran en líneas punteadas para cada TA (5, 10, 15, 20 y 25°C). 156

Fig. 5. 1. Modelo conceptual esquemático del control de la dormición en aquenios de girasol, generado a partir de los datos obtenidos en esta tesis. Se muestran los mecanismos fisiológicos implicados en la regulación de los fenotipos de dormición. 175

Fig. 5. 2. Modelo conceptual esquemático de la herencia de la dormición en aquenios de girasol, y los mecanismos fisiológicos implicados en la regulación del fenotipo. El esquema fue generado a partir de los datos obtenidos en esta tesis (capítulo 2 y 3). 177

Fig. 5. 3. Esquema conceptual de la velocidad de SD primaria en frutos de girasol en función de la HRe a partir de los resultados del capítulo 4. Se muestra la SD de aquenios, embriones y sensibilidad de embriones al ABA en una primera zona de HRe intermedias que conforma una zona (1) de almacenaje seguro y SD óptima. Luego en HRe altas se muestra una zona de SD poca segura (2) debido al aumento pronunciado de procesos de deterioro. El panel inferior muestra un esquema de las relaciones de sorción entre el CH y la HRe en frutos de girasol para dos situaciones térmicas de almacenaje. Luego se detallan factores que pueden modificar esta relación de sorción (p. ej. contenido de aceite del fruto, histéresis, morfología). 183

ABREVIATURAS/ SINONIMOS

- %: Porcentaje
 ≈: aproximado
 °C: grados centígrados
 °K: grados Kelvin
 μm: micrómetro.
 μM: micromolar
 μS: micro siemens
 μ_w: Potencial agua (en MPa)
 μ_w: Potencial químico del agua (J/mol)
 ♀: Materna
 ♂: Paterna
 ABA: Ácido abscísico
 AC: Análisis de clúster
 ACP: Análisis de componentes principales.
 ANOVA: Análisis de la varianza.
 a_w: actividad del agua
 CE: conductividad eléctrica (μS/cm-1 g-1)
 Ch: constante específica de la especie (0,0329) en la ecuación de viabilidad
 CH: contenido de humedad
 cm: centímetro
 CoCl₂: Cloruro de cobalto
 CP: componente principal en el ACP
 Cq: constante específica de la especie. (0,000478) en la ecuación de viabilidad
 Cw: constante específica de la especie (4,16) en la ecuación de viabilidad
 d: día/s
 DDA días desde comenzado el almacenaje
 DDC días desde cosecha
 DDF: días desde floración (R5.5)
 DEBT: dormición expresada a baja temperatura
 Dormancia = Latencia = Dormición
 EE: error estándar.
 Et: Etefón
 FAA: formaldehído, alcohol, acético.
 Fig.: Figura.
 G.A.10: Porcentaje final de germinación de aquenios a cosecha incubados a 10°C
 G.A.25: Porcentaje final de germinación de aquenios a cosecha incubados a 25°C

G.E.10: Porcentaje final de germinación de embriones a cosecha incubados a 10°C

G.E.25: Porcentaje final de germinación de embriones a cosecha incubados a 25°C

g: gramo

GA: Giberelinas

h: horas

H₂O: agua destilada

H₂O₂: peróxido de hidrogeno

HR: humedad relativa de (e) equilibrio del aire.

K₂CO₃: Carbonato de potasio.

Ke: constante específica de la especie (6.74) en la ecuación de viabilidad

kg: kilogramo

Ki: germinación inicial (probit) en la ecuación de viabilidad

m: metro

MDA: malondialdehído

mg: miligramo

MJ/m²: radiación incidente en mega Joule por metro cuadrado

ml: mililitros

mM: milimolar

MPa: Mega Pascal.

mV: milivolt.

n: número de repeticiones.

N₂: Nitrógeno gaseoso.

NaCl: Cloruro de sodio.

nd: sin datos.

ns: no significativo.

O₂: Oxígeno gaseoso.

PF: peso fresco del fruto

PS: peso seco del fruto

p: significancia estadística.

r: coeficiente de correlación lineal de Pearson.

R: contenido de gas ideal (8,3143 J/mol.K) en la ecuación de ψ_w .

ROS: especies reactivas de oxígeno

R1: Estrella visible (fase reproductiva). Scheneiter y Miller, 1981.

R²: Coeficiente de determinación.

R4: La inflorescencia comienza a abrirse. Se ven las flores liguladas. Scheneiter y Miller, 1981.

R5.1: Primera antesis. Scheneiter y Miller, 1981.

R5.5: Antesis media. Scheneiter y Miller, 1981.

R5.9: 90% de las flores en antesis. Scheneiter y Miller, 1981.

- R6: Floración completa y las flores liguladas comienzan a marchitarse. Scheneiter y Miller, 1981.
- R9: Las brácteas cambian a un color marrón. La mayor parte del receptáculo se torna marrón. Etapa asociada a la madurez fisiológica del cultivo.
- RECM: raíz del error cuadrático medio
- SD: Salida de la dormición.
- Semillas dormidas = semillas latentes = semillas durmientes
- T: temperatura en °Kelvin en la ecuación de ψ_w .
- T50.A.10: Tiempo de almacenaje postcosecha (d) necesario para alcanzar el 50% de germinación para aquenios incubados a 10°C
- T50.A.25: Tiempo de almacenaje postcosecha (d) necesario para alcanzar el 50% de germinación para aquenios incubados a 25°C
- T50.E.10: Tiempo de almacenaje postcosecha (d) necesario para alcanzar el 50% de germinación para embriones incubados a 10°C
- T50.E.25: Tiempo de almacenaje postcosecha (d) necesario para alcanzar el 50% de germinación para embriones incubados a 25°C
- T₅₀: Tiempo (d) en alcanzar el 50% de germinación durante el almacenaje
- TA: Temperatura de almacenaje (°C)
- T_b: Temperatura base
- TBA: ácido tiobarbitúrico
- TBARS: sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
- TCA: ácido tricloroacético
- Ti(50): Temperatura del límite inferior
- TI: factor de termo-inhibición (10-30 o 25-30)
- TI: Termo-inhibición
- Ts(50): Temperatura del límite superior
- v: germinación (probit) después de p días de almacenaje en la ecuación de viabilidad
- V_w: volumen molar parcial del agua (18,015 cm³mol⁻¹).
- x: Cruzamiento o híbrido
- α: nivel de significancia
- θT(50)(°Ch): Tiempo térmico requerido para que germine el 50% de la población de semillas
- σTi(50): Desviaciones estándar de la temperatura del límite inferior
- σTs(50): Desviaciones estándar de la temperatura del límite superior
- σθT(50): Desviación estándar del tiempo térmico

RESUMEN

Los frutos de girasol (*Helianthus annuus* L.) pueden presentar altos niveles de dormición a cosecha, los cuales se atenúan progresivamente durante la postcosecha. El nivel de dormición a cosecha depende del genotipo y del ambiente materno, mientras que la dinámica posterior puede modularse por el ambiente de almacenaje. Trabajos previos sugerían la existencia de variabilidad intraespecífica para los principales atributos (expresión en el rango térmico, persistencia) y el aporte relativo de las estructuras (cubiertas, embrión) a la dormición. El estudio de la variabilidad intraespecífica se abordó mediante el fenotipado de un panel de genotipos y la identificación de grupos funcionales. La variabilidad observada se interpretó como resultado de la superposición de dos mecanismos con relevancia opuesta en el rango térmico y con intensidad variable entre genotipos: la dormición expresada a bajas temperaturas (DEBT), y la termoinhibición (TI). La sensibilidad del embrión al ácido abscísico (ABA) varió entre genotipos y se relacionó positivamente con la DEBT y la TI, apoyando que ambas respuestas comparten esta vía regulatoria. Luego, se seleccionaron líneas contrastantes para la DEBT y TI y se realizaron cruzamientos recíprocos para determinar los patrones de herencia en la F1. El fenotipo de dormición estuvo principalmente definido por el genotipo del cigoto. La herencia de la TI fue exclusivamente por vía materna, aunque su transmisión a la F1 dependió del parental con TI, resaltando la interacción entre el embrión y las cubiertas. El rol de las cubiertas en la TI se asoció con un aumento de la sensibilidad al ABA a través de una restricción al ingreso de oxígeno (O₂). Contrario a lo esperado, los niveles endógenos de ABA se asociaron inversamente con los niveles de dormición de las líneas parentales, destacando la importancia de la sensibilidad del embrión al ABA (y no del metabolismo) detrás de las diferencias genotípicas. Finalmente se evaluó

la modulación de la dinámica de salida de la dormición (SD) entre cuatro niveles de contenido de humedad (CH; 4 a 10%) y temperatura de almacenaje (TA; -18 a 30°C), observando una fuerte interacción entre ambos factores. Los tratamientos de CH 6% y TA intermedias promovieron las mayores tasas de SD. La SD se inhibió con CH bajos (4%) y hacia TA menores, pero también se retrasó con valores de CH altos (8-10%) combinados con TA crecientes. En todos los casos la respuesta germinativa de los frutos se asoció con la sensibilidad de embriones al ABA. Los valores de tasa de SD se modelaron en función de la humedad relativa de equilibrio (HRe) de cada tratamiento, resaltando cuatro zonas de respuesta en torno a tres valores umbral. Esta tesis contribuye al conocimiento de los mecanismos de dormición en girasol, resultando de utilidad para la producción de semilla híbrida, en procesos de mejoramiento y manejo postcosecha.

Palabras Clave: Variabilidad genotípica, nivel de dormición, DEBT, TI, Herencia, ABA, almacenaje, CH, TA, SD.

ABSTRACT**Dormancy in sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes:
intraspecific variability and physiological mechanisms.**

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) fruits can exhibit high dormancy levels at harvest. Dormancy is progressively attenuated during post-harvest, but the time of dry storage required to become non-dormant may vary from a few weeks to several months. Dormancy level at harvest depends on the genotype and the maternal environment, while the release dynamics may also be influenced by the storage environment. Previous work suggested the existence of intraspecific variability for the main attributes (thermal range expression, persistence) and the relative contribution of fruit structures (coats, embryo) to dormancy. The study of intraspecific variability was approached by phenotyping a set of genotypes and identifying functional groups. The observed variability was interpreted as the result of two overlapping mechanisms with opposite relevance on the thermal range and with variable intensity between genotypes: low-temperature expressed dormancy (DEBT), and thermo-inhibition (TI). Embryo sensitivity to abscisic acid (ABA) varied between genotypes and was positively related to DEBT and TI, supporting that both responses share this regulatory pathway. Contrasting lines were selected for DEBT and TI, and reciprocal crosses were made to determine inheritance patterns in F1. The dormancy phenotype of hybrid achenes was mainly defined by the zygote genotype. Thermo-inhibition was maternally inherited, although its transmission to F1 depended on the TI parent, highlighting the existence of an interaction between embryo and coats. The role of the coat in TI was related to the imposition of hypoxia (by restricting gas exchange) and the enhancement of embryo sensitivity to ABA.

Contrary to expectations, endogenous ABA levels correlated negatively with dormancy levels of parental lines, highlighting the importance of embryo sensitivity to ABA (and not metabolism) behind different dormancy phenotypes. The effect of moisture content (CH) and temperature (TA) on dormancy release (SD) dynamics during post-harvest was investigated with four CH (4-10%) and six TA (-18°C to +30°C). A strong interaction was observed. Storage with CH 6% in combination with intermediate TA promoted the highest rates of dormancy release. Dormancy release was inhibited at low CH (4%) and towards lower TA but was also delayed at high CH values (8-10%) combined with increasing TA. In all cases, fruit germination response was associated with embryo sensitivity to ABA. SD rate values were modelled as a function of equilibrium relative humidity (HRe) for each treatment, showed four response zones around three threshold values. This thesis contributes to the understanding of dormancy responses and mechanisms in sunflower achenes. Information will prove useful to solve issues regarding the excess of dormancy along breeding programmes and during hybrid seed production and post-harvest management.

Keywords: Genotypic variability, dormancy level, low-temperature expression dormancy (DEBT), thermo-inhibition (TI), Inheritance, abscisic acid (ABA), storage, moisture content (CH), storage temperature (TA), dormancy release (SD).

Capítulo 1: Introducción general a la problemática de la dormición en girasol.

1.1. Introducción general.

La dormición primaria impide la germinación prematura de las semillas durante su desarrollo. En especies silvestres, la dormición también bloquea la germinación anticipada de la semilla madura permitiendo que actúen los mecanismos de dispersión, y finalmente restringe la germinación a aquellos ambientes más favorables para el establecimiento de la plántula (Benech-Arnold, *et al.*, 2000). Aunque en especies silvestres la dormición tiene un claro valor adaptativo (Karssen, 1982; Batlla y Benech-Arnold, 2010), en especies de uso agrícola una dormición prolongada más allá del momento de cosecha puede ser una característica indeseada, ya que altos niveles de dormición pueden afectar la emergencia de un nuevo cultivo (Rodríguez *et al.*, 2012; Benech-Arnold *et al.*, 2012) siendo la fase de establecimiento una etapa crítica para la maximización de los rendimientos de grano (Finch-Savage y Bassel, 2015). Para el caso del girasol, la obtención de aquenios con una dormición prolongada durante la postcosecha dificulta las tareas de procesamiento, aumenta los costos de producción e impide su rápida utilización como semilla, tanto en el mercado interno como en la producción para mercados en contra-estación (Bodrone *et al.*, 2017). El proceso de domesticación disminuyó los niveles de dormición en muchas especies cultivadas, como p. ej., los cereales (Barrero *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2015). En trigo, cebada y sorgo, la selección en contra de la dormición fue tan extrema que son frecuentes genotipos donde los granos pueden germinar antes de ser cosechados (brotado precosecha) como resultado de bajos niveles de dormición y la ocurrencia de lluvias a campo. El brotado precosecha ocasiona la pérdida de viabilidad y/o menor longevidad potencial de las semillas, con

pérdidas en la producción de semilla para siembra, y también alterando la calidad de los granos (Lunn Major *et al.*, 2001; Gualano *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2015). Sin embargo, en girasol, esta disminución ha ocurrido parcialmente (Radanović *et al.*, 2018; Smith, 2006), existiendo una importante variabilidad intraespecífica para este carácter (Subrahmanyam *et al.*, 2002; Maiti *et al.*, 2006; Vujaković *et al.*, 2012). La “semilla” de girasol es en realidad un fruto denominado cipsela o aquenio de ovario ínfero (de aquí en más, nos referimos como *aquenio*). Al momento de cosecha, los aquenios presentan un grado variable de dormición, el cual puede depender del genotipo en interacción con el ambiente de cultivo (“efecto materno”). Estudios previos mostraron que fechas de siembra tempranas y mayores temperaturas durante el desarrollo de los frutos resultan en mayores niveles de dormición al momento de cosecha (Fonseca, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003; Bodrone, 2014; Pizzorno *et al.*, 2015; Bodrone *et al.*, 2017; Pizzorno, 2021). Esta respuesta a la fecha de siembra se confirmó recientemente (en paralelo a esta tesis) a un rango más amplio de genotipos (Riveira Rubin *et al.*, 2021). Trabajos previos con girasol sugerían la existencia de diferencias en los patrones de expresión de la dormición dentro del rango térmico de incubación (inhibición de la germinación a altas o a bajas temperaturas; Corbineau *et al.*, 1990; Gay *et al.*, 1991), así como diferencias en cuanto a la participación del embrión y de las cubiertas del fruto (cubierta seminal –testa y endosperma- y pericarpio) en el mantenimiento de la dormición. En conjunto, estos trabajos reportados en la bibliografía sugerían la existencia de una variedad de mecanismos en los genotipos analizados. La falta de información consistente con respecto a los mecanismos implicados en el control de la dormición en girasol también dificulta predecir la herencia del carácter dormición dentro de

un programa de mejoramiento, o el desarrollo de tratamientos estandarizados o prácticas de manejo postcosecha para remover la dormición de lotes de aquenios dormidos.

1.1.1. Componentes estructurales de la Dormición

El fruto maduro de girasol está compuesto por un embrión en cuyos cotiledones se almacenan las reservas. A su vez, el embrión está rodeado por una capa de células de endosperma (formada por una capa de células vivas), la testa (formada por varias capas de tejido muerto, de origen materno) y finalmente el pericarpio (Fig. 1.1). La suma de estas estructuras que rodean al embrión se denomina “cubiertas” (Esau, 1977).

Las cubiertas pueden imponer una restricción mecánica para la expansión del embrión en algunas especies (p. ej., el endosperma micropilar en solanáceas y *Arabidopsis*) o impedir el ingreso de agua en otras (por ej., dormición física en fabáceas). Sin embargo, las cubiertas también pueden imponer una restricción fisiológica al embrión a través de la regulación del intercambio de compuestos solubles y gaseosos entre la semilla y el

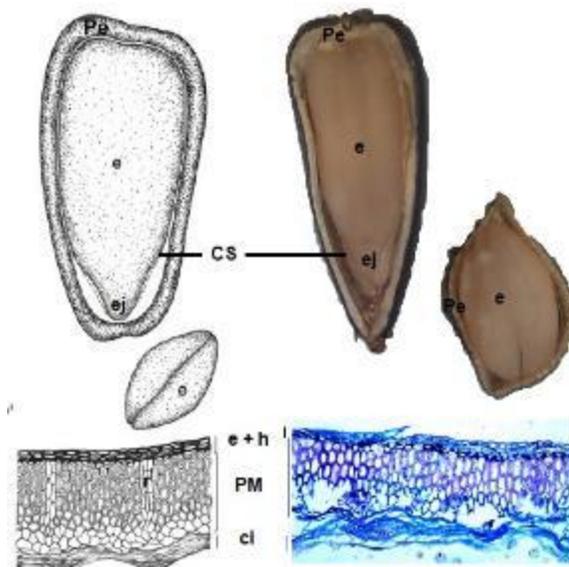


Fig 1. 1. Esquema e imágenes de una disección longitudinal de un aquenio de girasol, mostrando el pericarpio o cascara (Pe), cubierta seminal (CS), embrión (e) y su correspondiente eje (ej). Debajo se muestra un esquema e imagen de un corte de la región ecuatorial del pericarpio indicando la epidemia y la hipodermis (e+h), parénquima medio (PM), capas internas comprimidas (ci) y radios parenquimáticos (r). Esquema extraído de Lindstrom *et al.* (2007) e imágenes tomadas de esta tesis.

medio, o la presencia de inhibidores en las cubiertas (Bewley y Black, 1994). La dormición impuesta por cubiertas es común a muchas especies con dormición fisiológica, y se pone en evidencia cuando los embriones aislados germinan mientras que la semilla entera (o el fruto) no lo hace (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La estructura que impone restricción puede variar según la especie, como puede observarse en *Lactuca sativa* (endosperma), *Sinapis arvensis* (testa) y *Betula pubescens* (pericarpo). Algunos ejemplos de especies con dormición “embrionaria” son *Acer saccharum*, *Avena Fatua* y *Pyrus Communis* (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En función del momento de desarrollo y de post-maduración, los frutos de girasol pueden presentar dormición impuesta por el embrión y/o impuesta por las cubiertas (Le Page-Degivry *et al.*, 1990, 1996; Le Page-Degivry y Garello, 1992; Brunick, 2007). En este último caso, la dormición puede estar impuesta por la cubierta seminal “verdadera”, por el pericarpio o por ambas estructuras a la vez. La cubierta seminal incluye la testa y una fina capa de endosperma o aleurona, semejante a la que existe en semillas de *Arabidopsis* y la cual cumple una función crucial en el control hormonal de la dormición en esa especie (Bethke *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010).

En el girasol, durante estadios tempranos de desarrollo del fruto la dormición está principalmente impuesta por las cubiertas, mientras que la dormición embrionaria aumenta progresivamente hacia mediados del desarrollo donde es máxima y luego disminuye en el grano maduro. Así, la profunda dormición que los granos de girasol presentan al momento de cosecha resulta de la coexistencia de dormición impuesta por las cubiertas, y de un remanente de dormición embrionaria (Le Page-Degivry, *et al.*, 1990; Le Page-Degivry y Garello, 1992; Brunick, 2007). La dormición embrionaria generalmente se pierde durante

las primeras semanas del almacenaje, mientras que la dormición impuesta por las cubiertas persiste por más tiempo y puede llegar a requerir varios meses para revertirse (Bianco *et al.*, 1994). Aún no se conoce con exactitud qué características anatómicas y bioquímicas del pericarpio y de la cubierta seminal están implicadas en la regulación de la dormición en girasol. Tampoco se conocen en detalle cuál es el mecanismo por el cual las cubiertas inhiben la germinación del embrión, aunque se ha propuesto que se asocia con la restricción al ingreso de oxígeno (O₂), especialmente durante la incubación a altas temperaturas (Domínguez *et al.*, 2019).

1.1.2. Concepto de nivel de dormición y rango térmico de incubación

La presencia de dormición se manifiesta como la ausencia de germinación de semillas viables en condiciones de incubación que, en ausencia de dormición, serían adecuadas para la germinación. La dormición puede ser “absoluta” y entonces la germinación es nula en todas las condiciones de incubación. La dormición puede ser “relativa” y en ese caso se manifiesta en algunas condiciones ambientales. A medida que la dormición se atenúa, el rango de condiciones ambientales permisivas para la germinación se va ampliando hasta finalmente ser el máximo posible para el genotipo. Esta expresión de la dormición depende mayoritariamente de las condiciones ambientales durante la imbibición de la semilla (Hoang *et al.*, 2014), principalmente de la temperatura de incubación (Vegis, 1964). En algunas especies (por ejemplo, anuales de verano como el sorgo, maíz) la dormición se expresa a bajas temperaturas de incubación (las semillas germinan sólo a altas temperaturas, por ejemplo, 20-35°C), mientras que en otras (por ejemplo, la cebada y el trigo) se expresa a altas temperaturas (las semillas germinan sólo a bajas temperaturas, por ejemplo, 10-15°C; Batlla y Benech-Arnold, 2015). La expresión de la dormición a lo largo del rango térmico

también depende del nivel de dormición de las semillas. Durante el almacenaje en seco, a medida que se atenúa la dormición de las semillas, se amplía el rango térmico permisivo para la germinación (Vegis, 1964; Batlla y Benech-Arnold, 2015). En los girasoles cultivados, la expresión de la dormición puede aumentar hacia temperaturas bajas de incubación (es decir, 10-15°C; Bodrone *et al.*, 2017), hacia las temperaturas altas de incubación (por encima de 20-25°C; Domínguez *et al.*, 2019), o hacia ambos extremos (Corbineau *et al.*, 1990). Esto produce un patrón de respuesta positiva, negativa o bimodal para la germinación a lo largo del rango térmico (Fig. 1.2 B). Corbineau *et al.* (1990) propusieron que la expresión de la dormición a bajas temperaturas está relacionada con la dormición del embrión, que se pierde generalmente en las primeras semanas después de la cosecha (Bodrone *et al.*, 2017). Por el contrario, la expresión de la dormición a altas temperaturas (es decir, 25-30°C) es impuesta por las cubiertas y puede persistir durante más tiempo, y en algunos genotipos no se pierde durante el almacenamiento en seco postcosecha (Domínguez *et al.*, 2016, 2019) (Fig. 1.2 A). De hecho, en algunos genotipos de girasol, la inhibición de la germinación a temperaturas de incubación superiores a 25°C cumple la

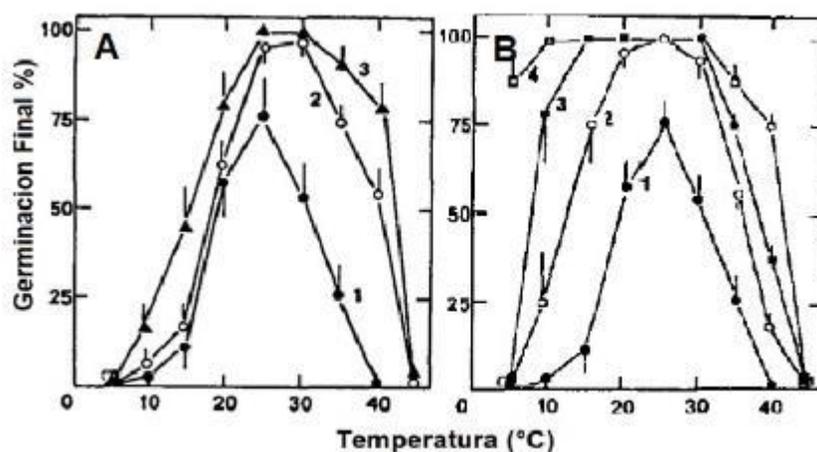


Fig 1. 2. Efecto de la temperatura de incubación sobre el porcentaje final de germinación (A) para aquenios (1), semillas (2) y embriones (3) al momento de cosecha, y (B) en aquenios de girasol recién cosechados (1) y almacenados en seco a 20°C durante un mes (2), 2 meses (3) y 6 meses (4) (Corbineau *et al.*, 1990).

definición de termo-inhibición (TI), propuesta por Hills y Van Staden (2003). La TI se define como la incapacidad de las semillas para germinar a altas temperaturas, aunque la germinación se produce inmediatamente cuando las semillas se transfieren a una temperatura más baja. Esto no es lo mismo que la termo-dormición que se produce a temperaturas aún más altas (40-45°C) y no se invierte inmediatamente al transferir los aquenios a una temperatura más baja (Corbineau *et al.*, 1990).

1.1.3. Control fisiológico de la dormición del aquenio, regulación hormonal y su interacción con las cubiertas.

El girasol posee una dormición de tipo fisiológica donde a pesar de que el embrión se encuentra totalmente desarrollado y sus cubiertas son permeables al agua, la habilidad de germinar depende de cambios químicos y fisiológicos (Baskin y Baskin, 1994). La dormición de semillas de un gran número de especies se encuentra mediada por las hormonas ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Bianco *et al.*, 1994). El ABA promueve la inducción y expresión de la dormición mientras que las GA promueven la germinación (Bewley, 1997). En girasol (así como en otras especies) la síntesis de ABA durante el desarrollo impone dormición (Conti *et al.*, 2004) mientras que en el fruto inmaduro y embebido es un requisito para el mantenimiento de la dormición (Le Page-Degivry *et al.*, 1990, 1996; Le Page-Degivry y Garello, 1992; Conti *et al.*, 2004). La síntesis de novo de ABA en el eje embrionario tiene un papel central en la dormición embrionaria en girasol, y si esta síntesis se bloquea (por ej., con Fluridone), se promueve la germinación de embriones dormidos (Le Page-Degivry *et al.*, 1990, 1996; Le Page-Degivry y Garello, 1992). A medida que los frutos post-maduran en seco, se ha reportado que esta capacidad de síntesis de ABA se pierde junto con la dormición embrionaria. También, las GA y el etileno agregado al medio promueven la germinación de frutos dormidos de girasol

(Bianco *et al.*, 1994; Corbineau *et al.*, 1990, 2014; Lee *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2018; Seiler, 1998).

Para abordar los mecanismos de dormición fisiológica que operan en el fruto de girasol, hay que considerar la acción integrada de las partes del fruto (cubiertas, embrión) y de las hormonas que controlan la germinación. Dentro de este esquema, las cubiertas podrían reprimir el crecimiento del embrión i) mediante el aporte directo de compuestos inhibidores desde las cubiertas hacia el embrión, o ii) limitando el intercambio de compuestos solubles y/o gaseosos entre la semilla y el medio (Bewley y Black, 1994).

Por un lado, las cubiertas podrían aportar compuestos inhibidores (p.ej. ABA) al embrión dentro del fruto embebido. Esta posibilidad aún no fue explorada en girasol. Sin embargo, en semillas de *Arabidopsis thaliana* (donde la dormición está impuesta por la cubierta seminal) se observó que la aleurona sintetiza y secreta ABA hacia el embrión, reprimiendo su germinación (Bethke *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015). Alternativamente, las cubiertas podrían promover la síntesis de ABA en el embrión durante la incubación del fruto entero. Éste, y otros posibles cambios en el metabolismo/señalización hormonal (que impactan en la dormición) podría estar dado a través del control de los niveles de O₂ en el embrión dentro del fruto embebido (Rodríguez *et al.*, 2015).

A partir de la imbibición de la semilla los niveles de O₂ debajo de las cubiertas disminuyen rápidamente como consecuencia de la reactivación del metabolismo y la baja permeabilidad de las cubiertas al O₂ (Rolletschek *et al.*, 2007; 2009). La disponibilidad de O₂ en el embrión podría afectar de manera directa al metabolismo hormonal, ya que participa como sustrato en reacciones de oxidación por enzimas como

la ABA 8'hidroxilasa (inactivación de ABA), ACC oxidasa (síntesis de etileno) y varias enzimas que intervienen en la síntesis de GA. Una función similar para las cubiertas se ha propuesto en semillas dormidas de *Arabidopsis* (Debeaujon *et al.*, 2000; Bethke *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015) y cariopses de cebada (Lenoir *et al.*, 1986; Benech-Arnold *et al.*, 2006). Sin embargo, en girasol, no se observaron diferencias en los niveles de ABA endógeno en semillas (sin pericarpio) incubadas en 5% y 21% de O₂ (Domínguez *et al.*, 2019). Recientemente se ha descrito en *Arabidopsis* y cebada una vía de censado de O₂ y óxido nítrico (N-End Rule Pathway) involucrada en respuestas a estrés abiótico (anegamiento, sequía) y también en el control de la germinación (Holman *et al.*, 2009, Gibbs *et al.*, 2011, 2014; Mendiondo *et al.*, 2015). Esta vía de señalización afecta la actividad de factores de respuesta a etileno (ERFVII) y estos a su vez interfieren con reguladores de la señalización del ABA como ABI5. Esta vía podría estar implicada en la dormición impuesta por cubiertas en girasol, modulando la sensibilidad a hormonas como etileno y ABA, y también las GA. La participación de esta vía en la inhibición de la germinación de semillas de *Arabidopsis* a altas temperaturas (25°C) fue recientemente demostrada por Wang *et al.* (2018).

Evidencias a favor de un rol del O₂ en la imposición de dormición en frutos de girasol surgen de ensayos con hipoxia (que inhiben la germinación de embriones aislados; Domínguez *et al.*, 2016, 2019), por un lado, y de remoción parcial del pericarpio (que promueven la germinación; Rodríguez *et al.*, 2015). Paralelamente, tratamientos de ambiente materno que redujeron el espesor del pericarpio, promovieron la germinación de frutos dormidos de girasol: Lindström *et al.* (2007) observaron que el sombreado durante la post-antesis redujo el espesor de las paredes celulares y el número de células

del parénquima medio del pericarpio. A su vez, Pizzorno (2021) realizó tratamientos de sombreado y observó un menor espesor del pericarpio y un menor nivel de dormición impuesto por cubiertas. Dicha respuesta se asoció también con menores niveles endógenos de ABA y menor sensibilidad de los aquenios al ABA.

Además de estas observaciones en girasol, son muchas las evidencias en otras especies mostrando que alteraciones en las cubiertas seminales impactan en la dormición. Por ej., en semillas de *Arabidopsis* se observó que la formación de una cutícula en la superficie externa de la aleurona es necesaria para la imposición de dormición (De Giorgi *et al.*, 2015). La acumulación de otros compuestos como taninos (Mac Gregor *et al.*, 2015) y suberina (Fedi *et al.*, 2017) en la testa, también son requisitos para la expresión de dormición en *Arabidopsis*. Semillas mutantes que carecen de alguno de estos compuestos se caracterizan por tener, además de poca o nula dormición, alta permeabilidad a compuestos solubles (como tetrazolio y ABA) y posiblemente al O₂.

1.1.4. Herencia de la dormición en el fruto de girasol

La dormición es un carácter cuantitativo gobernado por múltiples genes, y su herencia es compleja debido a que involucra tejidos y órganos de diversa composición genética de los parentales (Hilhorst, 1995; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). El aquenio de girasol es un fruto complejo, con diferentes partes que varían en su dotación genética. El embrión es diploide (1♀:1♂), el endosperma es triploide (2♀:1♂), y tanto la testa como el pericarpio son diploides (2♀; origen del ovario y receptáculo de la flor; Boesewinkel y Bouman, 1995). Dependiendo de la participación de las distintas estructuras en la dormición del aquenio se definen las vías de herencia, ya sean materna y/o paterna, en la progenie. La herencia materna puede resultar del predominio del genotipo materno en las cubiertas (pericarpio y/o cubierta

seminal), y/o de la existencia de factores citoplasmáticos (incluyendo las organelas, p. ej. ADN mitocondrial) que también son heredados exclusivamente por vía materna (en este caso pueden afectar el fenotipo del embrión; Roach y Wulff, 1987; Wolf y Wade, 2009).

La realización de cruzamientos recíprocos constituye una herramienta valiosa para investigar posibles efectos de herencia materna/paterna en la progenie (Johnson y Dhaliwal, 1976). Estos conocimientos son relevantes tanto para avanzar en la comprensión de los mecanismos de dormición que operan en esta especie, así como en la planificación de cruzamientos para la obtención de semilla híbrida con valor comercial donde alguno de los parentales presenta una dormición problemática. Trabajos previos en girasol (Presotto *et al.*, 2014; Weiss *et al.*, 2013; Seiler, 2007) han investigado la herencia de la dormición en frutos obtenidos a partir de la hibridación de girasoles cultivados y silvestres, dentro del contexto de la transferencia de genes (p. ej., transgenes que otorguen resistencia a herbicidas) hacia especies maleza. En genotipos cultivados, la selección se direccionó en lograr un incremento del tamaño de la semilla, una rápida y uniforme germinación, en detrimento de los niveles de dormición y espesor de las cubiertas (Hancock, 2012). La hibridación entre girasoles cultivados y maleza es algo frecuente en el campo, donde el polen del cultivo alcanza a fecundar flores de girasoles silvestres. La incorporación y persistencia de las semillas híbridas en el banco de semillas del suelo presenta un problema para su erradicación, siendo agravado por la presencia de dormición prolongada. Por un lado, Seiler (1998) encontró que la dormición profunda y prolongada en aquenios de varias poblaciones silvestres está determinada exclusivamente por las cubiertas (sin dormición embrionaria). Weiss *et al.* (2013) observaron que la semilla híbrida de girasol silvestre-cultivado presenta altos niveles de

dormición semejantes a los del parental materno silvestre. Estos trabajos apoyan la herencia materna de la dormición por cubiertas.

La dormición por cubiertas característica de los girasoles silvestres parece estar presente (aunque más atenuada) en algunos genotipos cultivados, particularmente en aquellos que presentan dormición extendida durante el almacenaje (o también ligada a la TI). Sin embargo, en algunos genotipos cultivados, la importancia relativa del aporte del embrión y de las cubiertas a la dormición del fruto entero puede variar enormemente. Debido a que el nivel dormición del fruto resulta una interacción compleja entre cubiertas y embrión, es aún difícil explicar el fenotipo de dormición que tendrá la progenie híbrida según los fenotipos de sus parentales. Por ejemplo, la dormición observada en una F1 híbrida podría variar según la susceptibilidad del embrión al efecto “restrictivo” que imponen las cubiertas de la madre. A su vez, esta característica del embrión podría estar definida por el genotipo del cigoto, o podría mostrar efectos maternos en el embrión (p. ej., por factores de herencia citoplasmática).

1.1.5. Efecto de las condiciones de almacenaje sobre la salida de dormición.

En especies que producen semillas con bajo contenido de humedad (CH) a madurez (denominadas semillas ortodoxas), la dormición primaria en girasol se pierde o atenúa progresivamente durante el almacenaje “en seco”. Este proceso, también llamado post-maduración, es afectado por la temperatura de almacenaje (TA) en muchas especies (Probert, 2000), incluyendo girasol (Bazin *et al.*, 2011^a). El patrón general muestra que mayores TA durante el almacenaje aceleran la salida de la dormición (SD) en muchas especies (Baskin y Baskin, 1976, 1986; Foley, 1994; Allen *et al.*, 1995; Bauer *et al.*, 1998; Steadman *et al.*, 2003^{a, b}; Chantre *et al.*, 2009), aunque esto puede verse afectado por el CH de las semillas

(Bazin *et al.*, 2011^a; Basbouss-Serhal *et al.*, 2016).

Debido al bajo CH con que habitualmente se equilibran las semillas (o frutos) en el almacenaje (humedad relativa de equilibrio -HRe- menores al 70%), algunos autores consideran improbable que los cambios en el nivel de dormición se deban a reacciones enzimáticas (Bewley *et al.*, 2013). De acuerdo con esto, se ha propuesto que la atenuación de la dormición durante el almacenaje en seco se debería a la ocurrencia de reacciones de oxidación no enzimáticas. Estas reacciones serían producidas por especies reactivas de oxígeno (ROS) que se forman espontáneamente en presencia de O₂ (Oracz *et al.*, 2007; Bazin *et al.*, 2011^a). De acuerdo con esta hipótesis, tratamientos con oxidantes (como el metilviologen; Oracz *et al.*, 2007) o almacenaje en hiperoxia (Morscher *et al.*, 2015; Buijs *et al.*, 2018) aceleraron la pérdida de dormición embrionaria en girasol y *Arabidopsis*. Estas condiciones a la vez promueven el deterioro oxidativo de las semillas que conducen a la eventual pérdida de viabilidad. Sin embargo, se ha observado que ambos procesos, pérdida de viabilidad y SD, no siempre están acoplados y pueden ocurrir a tasas diferentes indicando que son afectados deferencialmente por las reacciones de oxidación (Chahtane *et al.*, 2016). Los efectos del CH y de la TA parecen ser complejos y muestran fuertes interacciones en semillas de varias especies como *Ambrosia trifida* (Davis, 1930), arroz (Leopold *et al.*, 1988), *Avena fatua* (Folley, 1994), *Heteropogon contortus* (Baldos *et al.*, 2014) y *Arabidopsis* (Basbouss-Serhal *et al.*, 2016), pero aún no han sido caracterizados en detalle en el fruto de girasol. Por ejemplo, Bazin *et al.* (2011^a) reportaron que a bajos CH (menores al 5%, base PS) la pérdida de dormición embrionaria fue promovida por bajas TA, mientras que a CH mayores al 10% esta respuesta se invirtió, y altas TA aceleraron la SD con una temperatura base de 8°C. Sin embargo, este trabajo no exploró el rango de CH entre 5 y 10%

que es el que se establece en equilibrio con una atmósfera de 50-80% de HR (Ellis y Roberts, 1995) y habitualmente alcanzado en la industria semillera. En un trabajo del grupo de trabajo en FAUBA (Rodríguez *et al.*, 2018) se observó que el almacenaje a 25°C promovió la SD de aquenios en dos genotipos (una línea y un híbrido comercial) de girasol comparando con almacenaje a 5°C, y para un CH cercano al 6%. Esto amplió el rango de respuesta positiva a la TA previamente descrito por Bazin *et al.* (2011^a). Paralelamente, la posibilidad de manipular la tasa de SD durante el almacenaje ofrece una herramienta para el estudio de los mecanismos fisiológicos que imponen dormición y su comparación entre distintos genotipos. Debido a la aparente diversidad de fenotipos de dormición existentes en los girasoles cultivados, se plantea, además, la necesidad de ampliar la exploración de estas interacciones del CH y TA a otros materiales.

1.2. Objetivo e hipótesis de trabajo

El **objetivo general** es conocer los diversos mecanismos de dormición existentes en *Helianthus annuus* L.

Los **objetivos específicos** fueron:

- I.** Caracterizar diferentes “fenotipos” de dormición presentes en un conjunto de genotipos de girasoles cultivados y silvestres, según la expresión de este carácter dentro del rango térmico y la participación de las cubiertas del fruto (pericarpio y cubierta seminal).
- II.** Conocer los procesos fisiológicos involucrados en los diferentes “fenotipos de dormición” caracterizados en la etapa anterior. Se investigará el rol de diferentes hormonas (por ej., ABA, GA, etileno) y del O₂ en la expresión de la dormición.

- III.** Determinar el patrón de herencia (♀ , ♂) para los caracteres identificados como más relevantes en la determinación del nivel de dormición de frutos híbridos de girasol de acuerdo con los mecanismos fisiológicos identificados en los objetivos I y II.
- IV.** Caracterizar la SD (y del posible deterioro oxidativo) de aquenios almacenados en diferentes combinaciones de CH (entre 4 y 10%) y TA e identificar los cambios fisiológicos asociados a las respuestas observadas.

A partir de los objetivos citados anteriormente se proponen las siguientes **hipótesis** de trabajo:

Hipótesis asociadas con el Obj. I

- 1.** Las cubiertas (pericarpio y cubierta seminal) imponen dormición en genotipos que expresan dormición a altas temperaturas, mientras que la dormición a bajas temperaturas se asocia con una mayor dormición embrionaria.

Hipótesis asociadas con el Obj. II

- 2.** Algunas de las características anatómicas (espesor, compactación, grado de esclerosamiento, etc.) de las cubiertas (pericarpio, testa y endosperma) se asociarán con la dormición impuesta por cubiertas observada en los distintos genotipos de girasol evaluados.

Predicción: Genotipos que presenten mayores niveles de dormición por cubiertas tendrán mayor espesor de pericarpo, testa y/o endosperma, y/o mayor grado de esclerosamiento de alguna capa de tejido por fuera del embrión.

- 3.a.** El metabolismo del ABA en el aquenio embebido se asocia con la expresión de la dormición. A medida que la dormición de los frutos disminuye, los niveles de ABA en el fruto embebido disminuyen (se reduce la capacidad de síntesis *de novo* de ABA y/o aumenta el catabolismo de ABA).

Predicción: Aqueños incubados que presenten alto nivel de dormición mostrarán mayor contenido de ABA que aquellos con menor nivel de dormición. A su vez, el agregado de inhibidores de síntesis (Fluridone) o de catabolismo (Diniconazole) al medio de incubación afectará la respuesta germinativa de estos frutos.

3.b. Las cubiertas del fruto imponen dormición a través de la restricción de los niveles de O₂ en el embrión, y a su vez la hipoxia promueve una mayor sensibilidad del embrión al ABA, y/o aumenta los niveles endógenos de ABA.

Predicción: El efecto de las cubiertas en la inhibición de la germinación puede ser reemplazado por la incubación del embrión en hipoxia (<5% O₂). La hipoxia aumentará los niveles de ABA y/o la sensibilidad al ABA exógeno en embriones aislados comparando con embriones incubados en atmósfera normal. A medida que disminuya la dormición impuesta por cubiertas en postcosecha, el embrión perderá simultáneamente la sensibilidad al ABA y a la hipoxia.

4. Las hormonas GA y etileno intervienen en la regulación del nivel de dormición, antagonizando los efectos del ABA, aunque no son un requisito para la germinación en frutos despiertos.

Predicciones: i) Aplicaciones exógenas de GA y etileno promoverán la germinación de aqueños (en ensayos con frutos dormidos). ii) Se inhibirá la germinación en presencia de inhibidores de síntesis de GA (paclobutrazol, trinexapack-etil) y etileno (CoCl₂) en ensayos con frutos con dormición intermedia. iii) Esta respuesta a los inhibidores desaparecerá posteriormente durante el almacenaje. iv) En ensayos donde la germinación se inhibe por ABA, el agregado de etileno o GA revierte la inhibición.

Hipótesis asociadas con el Obj. III

5.a. La dormición del fruto de girasol está impuesta por el pericarpio y/o la cubierta seminal y se hereda por vía materna.

Predicción: Cuando un genotipo tiene alta dormición impuesta por cubierta y actúa de madre en una cruce, la progenie híbrida tendrá el mismo fenotipo independientemente del nivel de dormición del padre (la herencia materna domina por sobre el genotipo del cigoto).

5.b. La dormición embrionaria depende del genotipo del cigoto y no responde a una herencia materna.

Predicción: El fenotipo del embrión híbrido será independiente de la dirección del cruzamiento a partir de parentales con dormición contrastante; los híbridos recíprocos serán iguales entre sí. A su vez, este fenotipo dependerá de las relaciones de dominancia o codominancia entre los alelos parentales en el cigoto; los híbridos recíprocos serán más parecidos a un parental (dominancia completa) o serán intermedios a los parentales (dominancia incompleta o codominancia).

5.c. La dormición embrionaria está afectada por el genotipo materno evidenciando un efecto materno por encima del ADN nuclear del cigoto.

Predicción: El nivel de dormición embrionaria será diferente entre híbridos recíprocos y, en cada caso, se asemejará al fenotipo materno.

Hipótesis asociadas con el Obj. IV

6.a. La SD muestra interacciones con el CH y la TA. Esto se debe a que la dormición embrionaria y por cubiertas responde diferencialmente a las condiciones de CH y TA.

Predicción: Durante el almacenaje a diferentes combinaciones CH y TA los aqenios exhibirán diferentes tasas de SD; esto se asociará con cambios diferenciales en la pérdida de dormición embrionaria, y en la dormición por cubiertas.

6.b. La SD promovida por ciertas combinaciones de CH y TA será a través de cambios en el embrión que modifican su sensibilidad a la acción restrictiva de las cubiertas en la incubación y que involucra la acción del ABA (metabolismo de ABA y/o sensibilidad al ABA) (ver Hipótesis 3b).

Predicción: Condiciones de almacenaje (CHxTA) que promuevan la SD de aqenios presentarán menor sensibilidad de los embriones a la incubación en ABA y/o menores contenido de ABA endógeno durante la incubación.

6.c. La SD promovida por ciertas condiciones de almacenaje (CHxTA) presenta una asociación con el grado de deterioro que sufren los embriones bajo la post-maduración en seco.

Predicción: Condiciones de almacenaje que promuevan mayores tasas de SD de aqenios, coincidirán con un mayor grado de deterioro oxidativo de los mismos.

1.3. 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, y enuncia los objetivos e hipótesis. Los Capítulos 2 (“Variabilidad intraespecífica de la dormición: estudio de atributos fenotípicos y mecanismos fisiológicos asociados”), 3 (“Herencia de la dormición y termo-inhibición en aqenios híbridos de girasol. Estudio del rol de las cubiertas y del cigoto en estas respuestas”) y 4

("Efecto del ambiente de almacenaje sobre la post-maduración en seco de los aquenios") comprenden los resultados experimentales derivados de esta tesis, junto con su respectiva introducción, materiales y métodos, discusión y conclusiones. 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:

Variabilidad intraespecífica de la dormición: estudio de atributos fenotípicos y mecanismos fisiológicos asociados¹.

Resumen

La información sobre la variabilidad intraespecífica de la dormición en girasoles cultivados es escasa y fue el objeto de estudio de este capítulo. Se utilizó un conjunto de 21 genotipos de girasol de diversas fuentes de origen (cultivados y silvestres) para realizar un fenotipado de distintos caracteres de dormición. Los datos experimentales incluyeron la germinación del aquenio y del embrión a diferentes temperaturas de incubación, en agua o en ABA, y diferentes tiempos de almacenaje postcosecha. Mediante análisis multivariados se confeccionaron grupos de dormición que difirieron principalmente en sus patrones de expresión de la dormición a lo largo del rango térmico y su tasa de SD. Se interpretó que la variabilidad observada resultó de la superposición de dos mecanismos: la DEBT, común en todos los genotipos, y la presencia de TI a altas temperaturas de incubación exclusiva de algunos genotipos. La respuesta del embrión (semilla) al ABA varió entre genotipos y se relacionó positivamente con la DEBT, pero también con la TI a altas temperaturas, apoyando que ambas respuestas comparten una vía regulatoria común que opera en el embrión. Finalmente, se demostró la existencia de una considerable variabilidad intraespecífica para los atributos de dormición dentro de los girasoles cultivados y silvestres.

¹ Arata, G.J., Riveira-Rubin, M.A., Batlla, D. and Rodríguez, M.V. (2021), Dormancy attributes in Sunflower achenes (*Helianthus annuus* L.): I. Intraspecific variability. Crop Science. First published, 2 August 2021. <https://doi.org/10.1002/csc2.20610>

2.1. Introducción.

La dormición en las semillas es un rasgo complejo y hereditario, y que su intensidad al momento de cosecha y su persistencia durante la postcosecha dependen del genotipo, pero también puede ser modulada por el ambiente materno (a campo) y durante el ambiente de almacenaje (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Bazin *et al.*, 2011^a; Bodrone *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018). La domesticación ha logrado disminuir los niveles de dormición en muchas especies cultivadas (Hancock, 2012; Rodríguez *et al.*, 2015). Sin embargo, el girasol muestra una corta historia de domesticación (Radanović *et al.*, 2018; Smith, 2006) y el mejoramiento no se centró en la adquisición de una rápida germinación para su utilización como simiente. Además, las fuertes interacciones con el ambiente materno (Bodrone *et al.*, 2017; Riveira Rubin *et al.*, 2021) pueden dificultar el seguimiento de ciertos rasgos de dormición en los programas de mejoramiento. Muy pocos trabajos han abordado la variabilidad intraespecífica de la dormición en el girasol cultivado (Subrahmanyam *et al.*, 2002; Maiti *et al.*, 2006; Vujaković *et al.*, 2012), utilizando diferentes criterios de fenotipado por lo cual deberían realizarse estudios con un abordaje más completo e integral. Los estudios enfocados en abordajes genéticos (Gandhi *et al.*, 2005; Brunick, 2007) utilizando poblaciones segregantes a partir de cruza de genotipos cultivados y silvestres, arrojaron un alto número de QTL con efectos pequeños, con un patrón aplicable a otros atributos (Wills y Burke, 2007).

Aunque se han realizado algunos estudios detallados sobre los aspectos fisiológicos de la dormición en el girasol, la mayoría de los estudios se basan en unos pocos genotipos, por ejemplo, "Mirasol" (Le Page *et al.*, 1989, 1992, 1996; Corbineau *et al.*, 1990; Gay *et al.*, 1991; Bianco *et al.*, 1994), y "LG5665" (Oracz *et al.*, 2008; Bazin *et al.* 2011^{a, b}). En otros

trabajos, que incluían dos genotipos con diferentes respuestas a distintas hormonas, sugieren la existencia de cierta variabilidad en los mecanismos de dormición entre girasoles cultivados (Roselló *et al.*, 2016; Bodrone *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018; Domínguez *et al.*, 2019).

Por consiguiente, para comprender los mecanismos básicos que intervienen en la regulación de la dormición en girasoles cultivados se requieren estudios sobre una base de germoplasma más amplia, con frutos producidos y almacenados bajo las mismas condiciones ambientales de manera de reducir otras fuentes de variación de la dormición. El conocimiento actual sobre la variabilidad existente para la dormición entre los girasoles cultivados es aún insuficiente como para manejar este carácter a nivel productivo y en los programas de mejoramiento.

El objetivo del presente capítulo fue reconocer grupos “funcionales” de dormición dentro de los girasoles cultivados en nuestro país. Para los experimentos se reunieron materiales cultivados de acceso público, como líneas públicas de INTA y USDA ([Cuadro 2.1](#)). Dado que los rasgos de dormición suelen exacerbarse en genotipos silvestres en comparación con los materiales mejorados, se incluyeron algunas poblaciones invasoras de girasoles naturalizados en la región pampeana de Argentina (recogidas y detalladas por Cantamutto *et al.*, 2010; Presotto *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2017, 2019) para proporcionar fenotipos más extremos. Para cumplir con este objetivo general, se propuso (i) fenotipar un conjunto diverso de materiales de girasol, e identificar los atributos de dormición más relevantes (p. ej. expresión en el rango térmico, contribución de las estructuras del fruto, persistencia) para establecer grupos de dormición. Además, se buscó (ii) determinar una posible asociación

entre la sensibilidad del embrión al ABA y la variabilidad intraespecífica existente para los principales atributos de dormición.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Material vegetal y experimentos a campo

Se realizaron experimentos a campo (*1, 2 y 3*) con diferentes genotipos de girasol, cultivados en un mismo ambiente (“jardín común”) en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34 ° 25'S, 58 ° 25'W) durante dos años consecutivos (campañas 2015/2016 y 2016/2017). Los materiales en estudio incluían una variedad (Gigante de Rusia, GOR), 18 líneas públicas endocriadas aceiteras y tres poblaciones o accesiones de girasol silvestre/ ruderal de diferentes localidades de la pampa húmeda argentina (véase el [Cuadro 2.1](#)). Los genotipos cultivados (con diferentes antecedentes de mejoramiento) fueron proporcionados por mejoradores del INTA: Ing. Agr. Julio González, de la EEA Pergamino, e Ing. Agr. Mag. Daniel Álvarez, de la EEA Manfredi (algunas de estas líneas fueron obtenidas originalmente del USDA y otras mejoradas localmente). También se incluyeron una variedad provista por el criadero Ayerza Semillas S.A. (Pergamino) y tres poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* L. (multicéfalo) recogidas y descritas por el Dr. Alejandro Presotto de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca (Cantamutto *et al.*, 2010). Los *experimentos 1 y 2* se sembraron el 17 de septiembre de 2015 y el 25 de agosto de 2016 respectivamente, para evaluar y comparar diferentes atributos de dormición entre materiales. El *experimento 3* se sembró el 26 de septiembre de 2016 y se centró en unos pocos genotipos seleccionados por pertenecer a grupos fenotípicos diferentes ([Cuadro 2.1](#)).

Los experimentos a campo se sembraron en micro-parcelas (una por genotipo, asignada al azar en la parcela) con 3 (*experimento 1 y 2*) y 6 (*experimento 3*) hileras de 10 m cada una, utilizando una densidad de 5 plantas/m² y una distancia de 52 cm entre hileras. Las plantas se cultivaron con riego suplementario, se fertilizó, se realizó control químico de plagas y enfermedades, y se retiraron manualmente de malezas. La fenología de las plantas se siguió de acuerdo con la escala de Schneiter y Miller (1981). En el estadio R4 (la inflorescencia comienza a abrirse; vista desde arriba, las flores liguladas aún inmaduras son visibles), cada capítulo se cubrió con una bolsa de poliamida semipesado para evitar la polinización cruzada. Entre los estadios R5.1 (inicio de floración, 10% de las flores se encuentra en antesis o post antesis) y R5.9 (fin de floración, 90% de las flores se encuentra en antesis o post antesis) las plantas se polinizaron en forma manual con polen fresco recogido de otras plantas. En el caso de las poblaciones silvestres, debido al hábito indeterminado en su floración por la continua aparición de flores de las yemas axilares y/o ramas, sólo se utilizaron los cuatro primeros capítulos que aparecieron para reducir los posibles efectos maternos sobre la dormición. Los datos meteorológicos se registraron con una estación meteorológica situada en el lugar del experimento (Davis Vantage Pro2).

El muestreo de aquenios para determinar el CH comenzó unos 20-25 d después de la floración. Para cada genotipo y fecha de muestreo, se tomaron periódicamente muestras de cinco aquenios de cada una de las tres plantas del tercio medio del capítulo hasta madurez de cosecha (CH 11-12%, en base peso fresco -PF-). El CH se determinó gravimétricamente y el peso seco se obtuvo después de secar en estufa durante 120 minutos a 130°C. En el caso de los genotipos del *experimento 1* los capítulos se cosecharon cuando el CH de los aquenios alcanzó 6-7%. Esto significó que el momento de cosecha se retrase unos 15-25 d, lo que

permitió un avance parcial del proceso de post-maduración a campo en comparación con los siguientes experimentos (2 y 3) que se cosecharon a un CH mayor (tan pronto como el CH de los granos alcanzó el 11-12%). En todos los casos, los capítulos de las plantas que no diferían en más de cinco d para la fecha R5.5 se cosecharon juntas y se trillaron manualmente, conservando sólo los aquenios del tercio periférico y medio del capítulo. Los aquenios de las plantas de un mismo genotipo se agruparon y secaron en una secadora experimental a 35°C hasta alcanzar un CH del 6-7% (en base PF). Los aquenios secos se almacenaron dentro de bolsas de papel, luego cubiertas por bolsas de plástico con cierre hermético, y se mantuvieron en una cámara con temperatura controlada a 25°C constantes, en condiciones de oscuridad.

Cuadro 2. 1. Resumen de los genotipos de girasol utilizados en este trabajo. Las columnas (de izquierda a derecha) indican el nombre del genotipo; la estación de crecimiento (verano 2015/2016, 2016/2017) y el número de experimento (1-3); el peso seco unitario de los aquenios; el contenido de aceite (%) medido por NIR; la fuente/origen de los genotipos (en los casos donde estuvieron disponibles, se indica el número de accesión según el GRIN de USDA). Se indica con números en superíndice quienes suministraron los genotipos: ¹Alejandro Presotto, UNS. ²Julio González, INTA Pergamino. ³Daniel Álvarez, INTA Manfredi, ⁴Ayerza Semillas S.A.

Germoplasma	Año (Experimento)	Peso del aquenio (mg/aquenio)	Contenido de aceite (%)	Fuente/Origen
Silvestre				
AAL ¹	2015-16 (1) / 2016-17 (3)	23,6 ± 2,6	31	Adolfo Alsina, Buenos Aires (S 37°16', W 62°59').
BAR ¹	2015-16 (1)	12,7 ± 1,7	ND	Colonia Barón, La Pampa (S 36°10', W 63°53').
LMA ¹	2015-16 (1)	16,4 ± 0,2	26	Las Malvinas, Mendoza (S 34°47', W 68°15').
Cultivado				
1673 ²	2015-16 (1)	47,2 ± 5,1	52	USDA North Dakota x Ruso
1552 ²	2015-16 (1)	74,2 ± 4,3	49	Línea pública USDA (PI 413103)
HA89 ²	2015-16 (1) / 2016-17 (2, 3)	40,8 ± 1,5	50	Línea pública USDA (PI 650572)
600 ²	2015-16 (1) / 2016-17 (2, 3)	66,7 ± 0,5	49	Ruso x USDA North Dakota
609 ²	2015-16 (1) / 2016-17 (2)	39,3 ± 1,1	45	INTA Pergamino
1579 ²	2015-16 (1) / 2016-17 (2, 3)	49,7 ± 2,4	40	USDA North Dakota (PI 413130)
HA342 ³	2016-17 (2)	56,6 ± 1,8	52	USDA North Dakota (PI 509052)
B91 ³	2016-17 (2)	61,2 ± 3,1	ND	INTA Manfredi

B123 ³	2016-17 (2)	65,2 ± 1,9	ND	INTA Manfredi
GOR (“Gigante de Rusia”) ⁴	2016-17 (2)	99 ± 9,2	12	Ruso (PI 650408)
581 ²	2016-17 (2)	61,6 ± 4,1	45	Ruso x USDA North Dakota
587 ²	2016-17 (2)	46,2 ± 0,4	40	USDA ND x población INTA Pergamino
591 ²	2016-17 (2)	50,9 ± 3,2	41	Ruso x USDA North Dakota
561 ²	2016-17 (2)	36,2 ± 2	52	Ruso x USDA North Dakota
608 ²	2016-17 (2)	46,8 ± 1,5	46	INTA Pergamino
1575 ²	2016-17 (2)	53,5 ± 3,1	40	USDA North Dakota (PI 413126)
1679 ²	2016-17 (2)	33,9 ± 3,3	41	USDA ND x ruso
601 ²	2016-17 (2)	42,3 ± 2,8	43	INTA Pergamino x HA300 (línea pública USDA)

2.2.2. Pruebas de germinación.

Las pruebas de germinación se realizaron a diferentes temperaturas de incubación dentro del rango de 10 a 30 °C (10, 15, 20, 25 y 30 °C en los *experimentos 1 y 2*; 10, 20 y 30 °C en el *experimento 3*). Para evaluar la contribución de partes del fruto, se evaluó la germinación de embriones a 10 y 25 °C en los *experimentos 1 y 2*, y a 10 y 30 °C en el *experimento 3*. Para cada prueba de germinación, se incubaron triplicados de 25 aquenios/ 20 embriones por placa de Petri sobre papel de doble filtro y 6 ml (5 ml para los embriones) de agua destilada durante 15 d en cámaras a temperatura constante, sin iluminación complementaria. La germinación se contaba cada 2-3 d y las unidades germinadas se retiraron y se desecharon. Antes de retirar el pericarpio, los aquenios se embebieron en agua destilada entre 2/3 h para ablandar el pericarpio, que luego se retiró cuidadosamente con un bisturí. Para obtener embriones desnudos, luego se realizó un suave corte a lo largo de la línea que separa los cotiledones; las semillas con el "corte de cubierta seminal" se dejaron incubar hasta 24 h, lo cual permitió que la cubierta salga fácilmente sin dañar el embrión. El criterio para considerar una unidad como "germinada" fue, en aquenios, observar la extrusión de la radícula por fuera del pericarpio; en semillas y embriones, cuando la radícula se alargó más de 3 mm y ésta comenzó a curvarse. El porcentaje final de germinación se obtuvo relativizando al total de unidades incluidas (aquenios, semillas, embriones) y se promedió entre réplicas (n=3, y su correspondiente error estándar -EE-). Los ensayos de germinación se realizaron al momento de cosecha (inmediatamente después del secado) y en diferentes momentos del almacenaje (30, 60 y 150 días desde cosecha -DDC- para el *experimento 1*, y 30, 60 y 90 DDC para los *experimentos 2 y 3*).

En el *experimento 3*, la germinación de semillas en ABA se evaluó al momento de cosecha (0 DDC) y durante el almacenaje postcosecha (30, 60 y 90 DDC). Se incubaron réplicas de 25 aquenios y 20 semillas en agua destilada respectivamente (tratamiento de control); triplicados con 20 semillas en 100 μ M de Flurocloridona (Herbicida comercial; en el *experimento 3*), un inhibidor de la síntesis de ABA, en combinación con diferentes concentraciones de ABA (de SIGMA-Aldrich1, 5 y 50 μ M). La Flurocloridona se utilizó para eliminar las posibles diferencias en la síntesis de ABA entre genotipos, al momento de evaluar la germinación en concentraciones fijas de ABA suministradas de manera exógena (Bodrone *et al.*, 2017).

2.2.3. Análisis estadístico

2.2.3.1. Variables de estudio

Para realizar los análisis multivariados de componentes principales y de conglomerados (ACP y AC) se tuvieron en cuenta las siguientes variables: (i) Porcentaje final de germinación promedio ($n=3$) al momento de cosecha para los aquenios incubados a 10 y a 25°C (G.A.10 y G.A.25) y para los embriones incubados a 10 y a 25°C (G.E.10 y G.E.25) ([Fig. S. 2.1 A](#)). (ii) El tiempo de almacenaje (DDC) necesario para alcanzar el 50% de germinación para aquenios y embriones, incubando a 10 y a 25°C (T50.A.10, T50.A.25, T50.E.10 y T50.E.25). (iii) El factor de termo-inhibición (FTI) se obtuvo restando el valor máximo de germinación de aquenios alcanzado durante la postcosecha (lo que generalmente ocurrió a una temperatura de incubación entre 10 y 25°C según el experimento y los genotipos), al valor máximo de germinación alcanzado a 30°C. En el *experimento 1*, para el cálculo del FTI, se utilizó la germinación a 10°C ya que a esta temperatura se obtuvo la máxima germinación para las poblaciones silvestres (es decir, FTI.10.30; véase la [Fig. S 2.1](#)

B), En el *experimento 2*, el FTI se calculó como la diferencia entre la germinación máxima alcanzada a 25 y 30°C (FTI.25.30). Esto se debió a que los valores de germinación más altos se alcanzaron a 25°C (que a 10°C) dentro del período de almacenaje de 90 DDC.

2.2.3.2. Análisis multivariado de los datos de germinación

Para el ACP, las variables de estudio se normalizaron a una escala común. El AC se realizó utilizando la distancia media euclídea y el método de jerarquización "Ward". Tanto el ACP como el AC se realizaron utilizando el programa de estadísticas R y el "FactorMineR", "Factorextra" y "ggsci" (Central Core R, 2017).

2.2.3.3. Desarrollo y validación de modelos de germinación

Estos modelos de germinación se elaboraron en 3 germoplasmas representativos de los grupos/fenotipos de dormición encontrados (AAL, 1579 y 609) en los análisis multivariados del *experimento 1*. Los parámetros que describen la amplitud del rango térmico permisivo para la germinación durante la atenuación de la dormición, se cuantificaron empleando un modelo matemático poblacional de umbrales. Estos modelos suponen que los aqenios pueden germinar entre una temperatura límite inferior y otra superior, que tienen una distribución normal dentro de la población de aqenios (Washitani, 1987). Estos límites pueden caracterizarse por la temperatura media inferior $-T_i(50)$ - y superior $-T_s(50)$ - y sus respectivas desviaciones estándar $-\sigma T_i(50)$; $\sigma T_s(50)$ - (Batlla y Benech-Arnold, 2015; Fernández Farnocchia *et al.*, 2019). De acuerdo con esto, la fracción de aqenios que germinan a una temperatura de incubación determinada se calculó como:

$$p(T) = \Phi [(T - T_i(50)) / \sigma T_l(50)] - \{1\Phi [(T - T_h(50)) / \sigma T_h(50)]\} \quad (1)$$

donde "p(T)" es la proporción de aqenios que germinan a la temperatura "T" y "Φ" es la función de distribución normal estándar acumulada. El modelo supone que para la fracción

de aquenios en la que "T" se encuentra dentro de los límites " $T_i(50)$ " y " $T_s(50)$ ", la tasa de germinación depende de la acumulación de tiempo térmico por encima de un valor umbral y por debajo de un valor óptimo. También se considera que el tiempo térmico se distribuye normalmente en la población de aquenios con una media ($\theta T(50)$) y una desviación estándar ($\sigma\theta T(50)$); mientras que las temperaturas cardinales para la germinación, por debajo del rango térmico sub-óptimo (temperatura de base - T_b - y temperatura óptima - T_o -) se consideran constantes para toda la población. Así, el tiempo térmico en el rango térmico sub-óptimo (θ_{sub} ; entre T_b y T_o) puede calcularse para diferentes fracciones de la población (g) de la siguiente manera:

$$\theta_{sub}(g) = (T - T_b)tg(2)$$

donde, tg es el tiempo necesario para completar la germinación de la fracción g de la población. El modelo supone que las temperaturas cardinales para la germinación de aquenios en el rango sub-óptimo (T_b y T_o) permanecen invariables durante la atenuación e inducción de la dormición (Kruk y Benech-Arnold, 1998; Batlla *et al.*, 2009; Arana *et al.*, 2016). El cálculo de los parámetros se realizó en aquellos casos en los que la germinación fue mayor al 10% en al menos una de las temperaturas de incubación (ausencia de dormición absoluta). La T_b de germinación se calculó ajustando modelos no lineales sobre los datos de germinación observados a diferentes temperaturas de incubación para determinar el tiempo necesario en alcanzar el 50% de germinación (t_{50}). Luego se calculó la tasa de germinación del 50% ($1/t_{50}$) en función de la temperatura de incubación y se ajustó un modelo lineal para determinar la T_b como el valor "X", donde "Y" alcanzó 0. Para cada genotipo hubo una T_b única, que se calculó cuando todas las temperaturas de incubación mostraron su máximo nivel de germinación. Los parámetros medios - $T_i(50)$, $T_s(50)$ y $\theta T(50)$ - con sus desviaciones

$-\sigma T_i(50)$, $\sigma T_s(50)$ y $\sigma \theta T(50)$ - se estimaron mediante un procedimiento de optimización no lineal utilizando la herramienta Solver de Microsoft Excel. Los valores óptimos de los parámetros se lograron minimizando el RECM entre los datos observados y los simulados.

2.2.3.4. Análisis de regresión lineal y correlación

Para el *experimento 3* (valores medios, $n=3$) se correlacionaron los valores promedio de germinación final de aquenios incubados en agua en función de los valores promedio de germinación final de semillas en ABA $5\mu\text{M}$, analizando por separado los datos obtenidos a 10 y a 30° de incubación. Los análisis se realizaron con el Graphpad Prisma 7, y se mostraron los coeficientes de determinación y correlación de Pearson.

2.3. Resultados

2.3.1. Fenología y ambiente explorado durante el desarrollo y maduración de los frutos.

Dentro de cada experimento a campo, se observaron algunas diferencias en la fenología y el tiempo a floración (R5.5) con ligeras variaciones en las condiciones ambientales exploradas por cada genotipo. Por ej., en el *experimento 1* los materiales cultivados florecieron dentro de una ventana temporal de 10 d y los ruderales se demoraron entre 7 y 18 d con respecto al cultivado con floración más tardía. La ventana temporal para R5.5 en los cultivados se amplió a 25 d en el *experimento 2*. Sin embargo, dentro de cada experimento, las condiciones de temperatura (reflejadas en la temperatura media diaria promedio) y de radiación (radiación media diaria promedio) en la etapa R5.5-cosecha variaron poco entre genotipos ([Cuadro S. 2.1](#)). Aunque la siembra de los *experimentos 1* y *3* (en mayor medida que *1*) se demoró con respecto al *experimento 2*, este desfase entre experimentos se redujo a un lapso de 7-14 d para R5.5 como resultado del acortamiento de la fase vegetativa en las siembras más tardías.

2.3.2. Análisis multivariado para los atributos de dormición.

2.3.2.1. Experimento 1

Los resultados del ACP con los datos de germinación del *experimento 1* se muestran en la Fig. 2.1.A. Los componentes principales (CP) 1 y 2 explicaron el 55,2 y el 24,4% de la variabilidad total respectivamente. Los autovectores a lo largo de CP 1 fueron G.A.10 y G.A.25 (mayor porcentaje de germinación tanto a 10 como a 25°C al momento de cosecha), T50.A.10 y T50.A.25 (aumento del tiempo de almacenaje hasta alcanzar el 50% de germinación, o una menor velocidad en la pérdida de dormición), y FTI.10.30 (que refleja las diferencias en la máxima germinación en ambos extremos del rango térmico explorado). El CP 2 discriminó según los vectores G.E.10 (germinación al momento de cosecha de los embriones a 10°C) y T50.E.10 (tiempo de almacenaje necesario para alcanzar el 50% de germinación para los embriones a 10°C).

A partir del AC se conformaron 3 grupos con atributos de dormición semejantes (Fig. 2.1.B) plasmados luego en el ACP. El grupo 1 incluyó genotipos con menor dormición al momento de cosecha, situados en el extremo izquierdo del CP1 proyectado por los vectores G.A.25 y G.E.10. Los genotipos con mayores niveles de dormición conformaron el grupo 3, hacia el extremo derecho de CP1 junto con los vectores T50.A.10, T50.A.25 y FTI.10.30. Este grupo estuvo conformado exclusivamente por las poblaciones silvestres (AAL, LMA y BAR). La línea endocriada 1579 (único miembro del grupo 2) compartió atributos con los genotipos del grupo 3: una alta dormición de los aquenios al momento de cosecha (opuestos a los vectores G.A.25 y G.E.10), y una respuesta negativa a la temperatura de incubación (mayor germinación a 10°C en comparación con 30°C) relacionado positivamente con el vector FTI.10.30. Según las tasas de SD para aquenios, 1579 estuvo más cerca del origen de los

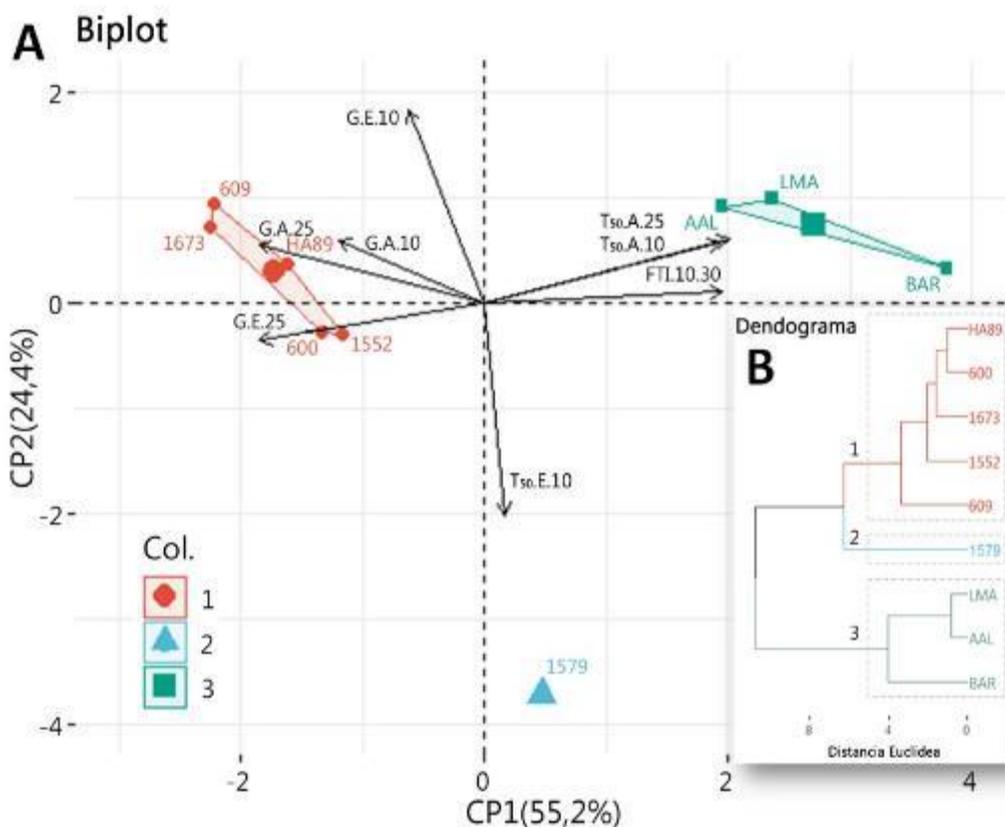


Fig. 2. 1. (A) Biplot correspondiente a los dos primeros CP de los 9 genotipos analizados en el *experimento 1*. Cada punto representa un genotipo: cultivado (grupo 1, círculos rojos), cultivado con TI (grupo 2, triángulo celeste) y *H. annuus* silvestre (grupo 3, cuadrados verdes). Los símbolos pequeños indican cada genotipo y los símbolos grandes marcan el centro de cada grupo. Los vectores desde el origen (flechas negras) representan las variables de estudio (ver sección Materiales y métodos). **(B)** Análisis de clúster. Dendrograma obtenido a partir de los genotipos y variables analizadas en el biplot del *experimento 1*. Las líneas punteadas sobre el eje de distancia euclídea muestran los 3 grupos funcionales representados en el biplot.

vectores T50.A.10 y T50.A.25, lo que refleja una tasa intermedia de SD. Finalmente, 1579 exhibió una dormición embrionaria profunda a baja temperatura de incubación, tanto al momento de cosecha como durante el almacenaje postcosecha (menor G.E.10 y mayor T50.E.10), lo que desplazó al genotipo 1579 hacia la parte inferior del CP2 y lejos de los otros grupos.

Los resultados del AC aplicados a los datos de germinación en el *experimento 1* se muestran en la Fig. 2.1 B. Además, en las Fig. 2.2 y 2.3 se muestran datos fenotípicos adicionales (como germinación en el rango térmico de incubación en diferentes tiempos durante la

postcosecha, y la dinámica de SD en achenios y embriones a temperaturas contrastantes en el rango térmico) para cada grupo encontrado en el AC. El primer nodo separó genotipos cultivados de silvestres y el segundo nodo separó al genotipo 1579 del resto de los genotipos cultivados. Los girasoles silvestres (grupo 3) mostraron una alta dormición al momento de cosecha (es decir, sin germinación a ninguna temperatura de incubación; Fig. 2.2), con una dormición impuesta por el pericarpio tanto a 10 como a 25°C (los embriones aislados

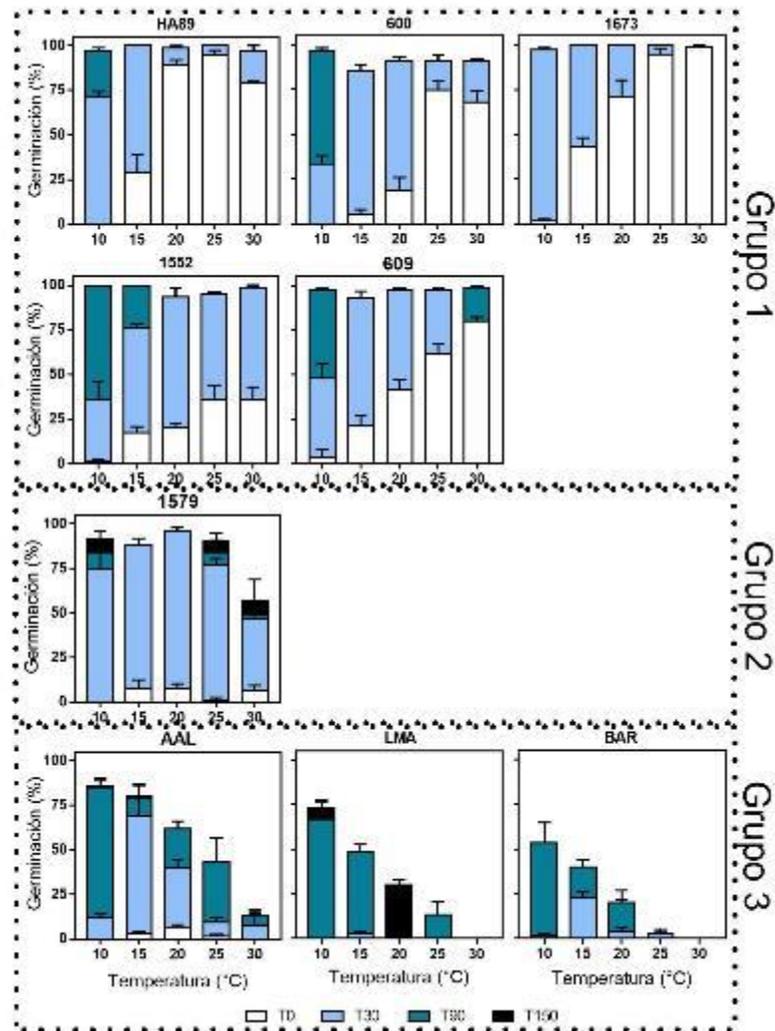


Fig. 2. 2. Germinación final acumulada (%) durante distintos momentos después de la cosecha para distintas temperaturas de incubación (10 a 30°C). Los momentos postcosecha evaluados son 0 (barras blancas), 30 (barras celestes), 90 (barras azules) y 150 DDC (barras negras). Cada subfig. representa un genotipo. Los rectángulos con líneas punteadas negras representan el grupo al que pertenece cada genotipo según el AC del *experimento 1*. Cada barra representa la media \pm su EE (n=3).

germinaron; Fig. 2.3). Luego de tres meses de almacenaje en seco, se observó un aumento de la germinación a temperaturas bajas de incubación (10-15°C), mientras que la TI (a temperaturas de incubación más altas) persistió aun después de cinco meses (Fig. 2.3). Los genotipos del grupo 1 expresaron una menor dormición de los aquenios desde la cosecha, y la expresión de la dormición aumentó hacia temperaturas de incubación más bajas (p. ej. 609, Fig. 2.2). La dormición del aquenio en este grupo mostró una dormición intermedia-

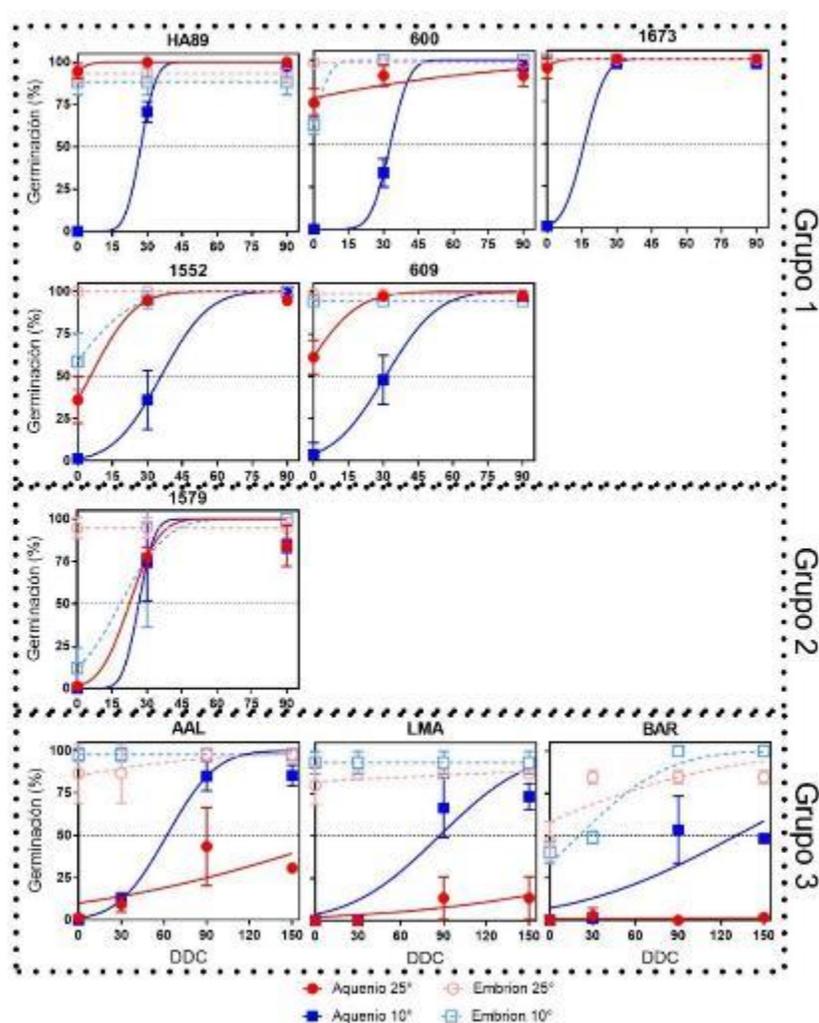


Fig. 2. 3. Germinación final (%) en función de los DDC para aquenios incubados a 25°C (líneas y círculos llenos rojos) y a 10°C (líneas y cuadrados llenos azules), y para embriones incubados a 25°C (línea punteada y círculos vacíos rosas) y a 10°C (línea punteada y cuadrados vacíos celestes). Cada subFig. representa un genotipo y los recuadros punteados representan los grupos obtenidos mediante el AC del *experimento 1*. Cada punto representa la media \pm su EE (n=3).

baja impuesta por las cubiertas desde la cosecha (baja dormición embrionaria), y no mostraron TI a 30°C. La línea 1579 (único miembro del grupo 2), tuvo una dormición absoluta al momento de cosecha y casi no germinó a ninguna de las temperaturas de incubación (Fig. 2.2). La dormición a 25°C fue impuesta por las cubiertas del fruto (los embriones germinaron completamente), mientras que la germinación a 10°C estuvo limitada por el propio embrión. Tan solo 30 d fueron suficientes para reducir la dormición impuesta por las cubiertas expresada a 25°C, y la dormición del embrión y aquenio expresada a 10°C (los valores de germinación del aquenio alcanzaron el 75% a ambas temperaturas, Fig. 2.3). Después de 3 meses de almacenaje en seco, la germinación final superó el 85% a 10 y 25°C. Sin embargo, la germinación a 30°C no aumentó más allá del 60% incluso después de cinco meses (150 DDC) de almacenaje, lo que indica cierto grado de TI para este genotipo.

2.3.2.2. Experimento 2

El *experimento 2* incluyó 12 nuevos genotipos cultivados, además de las líneas endocriadas 600, 609, 1579 y HA89 analizadas anteriormente (ver Cuadro 2.1). Las variables fenotípicas fueron las mismas que en el *experimento 1*, excepto el FTI.25.30 que refleja específicamente la caída del porcentaje de germinación entre 25 y 30°C. Como se muestra en el biplot del ACP (Fig. 2.4 A), los genotipos se separaron en cinco grupos. Los dos primeros CP explicaron el 57,4 y el 13,3% de la variabilidad total. Los autovectores que contribuyeron al CP1 fueron G.E.25, G.E.10 y G.A.25 (valores de germinación de aquenios y embriones al momento de cosecha) y, en sentido contrario sobre este eje, T50.A.10, T50.A.25, T50.E.10, T50.E.25 (reflejando la persistencia de la dormición a 10 y 25°C de incubación) y FTI.25.30. Nuevamente, los genotipos con menor dormición (o valores de germinación más altos) al

momento de cosecha se ubicaron a la izquierda del biplot (p. ej., 561 y B91 del Grupo 1), mientras que los genotipos con baja germinación de aquenios y embriones (o dormición más profunda) se situaron en de forma opuesta sobre el extremo derecho del CP1 (p. ej., HA342, B123 del Grupo 5). Entre estos grupos de dormición más extremos, los genotipos restantes se separaron en tres grupos intermedios que difirieron en el nivel de dormición al momento de cosecha, la persistencia durante el almacenaje en seco y la presencia/ausencia de TI.

Los cinco grupos de dormición ordenados por el AC se muestran en la Fig. 2.4 junto a datos fenotípicos adicionales de los genotipos (Fig. 2.5, 2.6). El primer nodo segregó según la

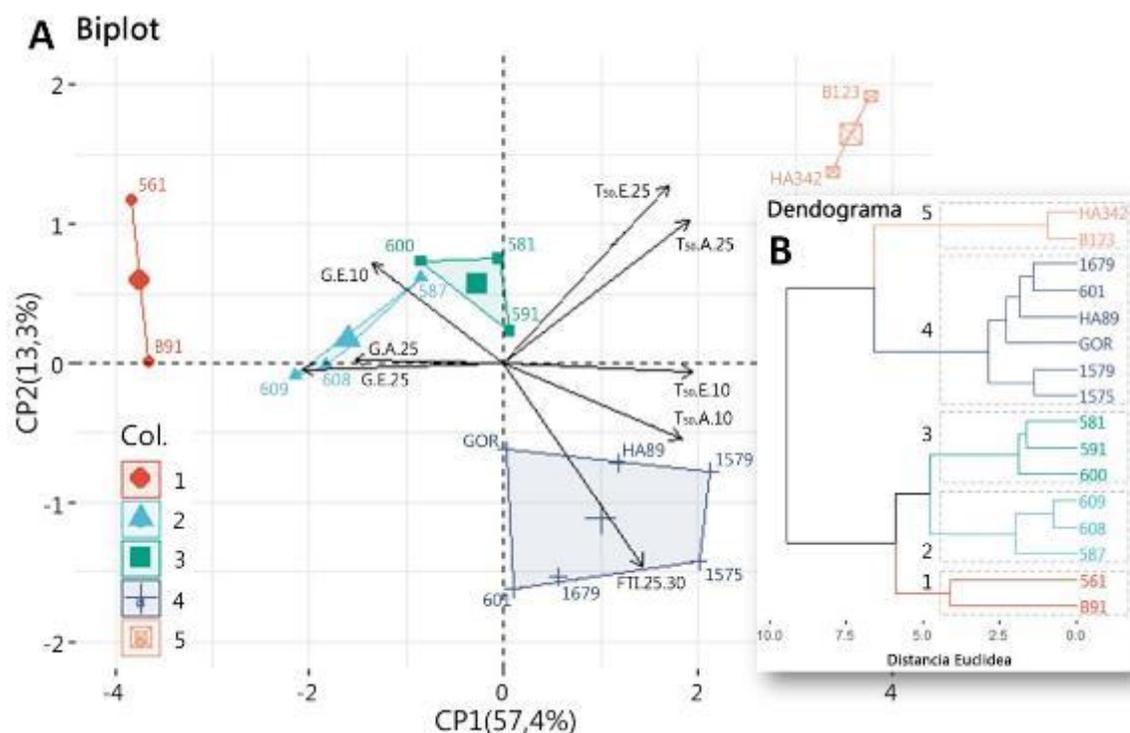


Fig. 2. 4. (A) Biplot correspondiente a los dos primeros componentes principales (CP) de los 16 genotipos cultivados analizados en el *experimento 2*. Cada punto representa un genotipo: nivel bajo (grupo 1, círculos rojos), nivel intermedio (grupo 2 y 3, triángulos celestes y cuadrados verdes respectivamente), nivel intermedio con TI (grupo 4, cruces violetas) y nivel alto de dormición (grupo 5, cuadrados abiertos y cruces naranjas). Los símbolos pequeños indican cada genotipo y los símbolos grandes marcan el centro de cada grupo. Los vectores desde el origen (flechas negras) representan las variables de estudio (ver la sección 2.2. *Materiales y métodos*). **(B)** Análisis de clúster. Dendograma obtenido a partir de 16 genotipos y las variables analizadas en el biplot. Se muestra un punto de corte sobre el eje de distancia euclídea, identificando los 5 grupos proyectados en el biplot.

presencia (grupos 4 y 5) o ausencia de TI (grupos 1 a 3). Dentro de cada una de estas dos categorías principales, los nodos separaron los grupos según el nivel de dormición al momento de cosecha y la persistencia durante el almacenaje. El grupo 1 (B91 y 561) se caracterizó por tener valores de germinación de aquenios más altos (dormición más baja) al momento de cosecha. En este momento, la expresión de la dormición del aquenio y del embrión aumentó a temperaturas bajas de incubación (10°C), mientras que los aquenios y los embriones incubados a 25°C germinaron alrededor del 40-50% y el 100% respectivamente. La expresión de la dormición del aquenio se impuso en mayor medida por las cubiertas del fruto a 25°C y 10°C (diferencia entre la germinación del aquenio y del embrión en B91, ver Fig. 2.6), y desapareció completamente después de 30 y 60 DDC, respectivamente. El fenotipo de dormición para los girasoles del grupo 2 (587, 608 y 609) fue muy similar al del grupo 1, excepto por tener una dormición más profunda del aquenio al momento de cosecha. Además, en ambos grupos (1 y 2) la dormición estuvo impuesta principalmente por las cubiertas, sin mostrar TI por parte de los aquenios. En comparación con los grupos 1 y 2, los genotipos del grupo 3 (581, 591, 600) tuvieron un mayor nivel de dormición del aquenio y embrión al momento de cosecha. Aunque la dormición embrionaria se perdió poco después de cosecha (similar al grupo 2), los genotipos del grupo 3 tuvieron una fuerte dormición impuesta por las cubiertas tanto a 10°C como a 25°C, siendo más persistente durante el almacenaje (se necesitaron tres meses para alcanzar aproximadamente el 50% de germinación del aquenio a 10°C, y el 100% a 25°C). Los genotipos del grupo 3 tampoco presentaron TI a 30°C. Los miembros del grupo 4 (1579, 1575, 1679, GOR, HA89 y 601) también tuvieron mayores niveles de dormición al momento de cosecha que se perdió primero a 25°C y luego a 10°C, y con una velocidad similar al grupo 3. En el grupo 4 la

dormición de los embriones al momento de cosecha fue más alta y persistió durante más tiempo, pero se diferenció principalmente del anterior (3) por la presencia de TI (es decir, menor germinación a 30°C que a 25°C). Los genotipos del grupo 5 (HA342, B123) se caracterizaron por tener los mayores niveles de dormición embrionaria al momento de cosecha (a 10 y 25°C) la cual persistió durante gran parte del almacenaje. La dormición embrionaria limitó la germinación del aquenio a 10°C durante el almacenaje postcosecha, mientras que el efecto inhibitorio de las cubiertas del fruto sólo se observó a 25°C una vez avanzado el almacenaje (90 DDC). También se observó TI para ambos genotipos de este grupo (menor germinación a 30°C que a 25°C).

A pesar de las diferencias observadas en los valores de germinación al momento de cosecha y durante el almacenaje, todos los girasoles analizados en el *experimento 2* compartieron un patrón común de respuesta a las temperaturas de incubación entre 10 y 25°C. En todos los casos, la dormición se expresó en mayor medida a los 10°C, y la pérdida de dormición se produjo primero a temperaturas de incubación más cálidas. Este fenómeno se denominó "dormición expresada a baja temperatura" o "DEBT". A su vez, la TI se expresó en algunos genotipos, y se asoció con niveles crecientes de DEBT. No obstante, la presencia de TI varió entre los genotipos de los grupos 3 y 4, ambos con niveles intermedios de dormición y con un patrón similar de DEBT (p. ej. comparando los genotipos 1579 y 591 de las Fig. 2.5, 2.6).

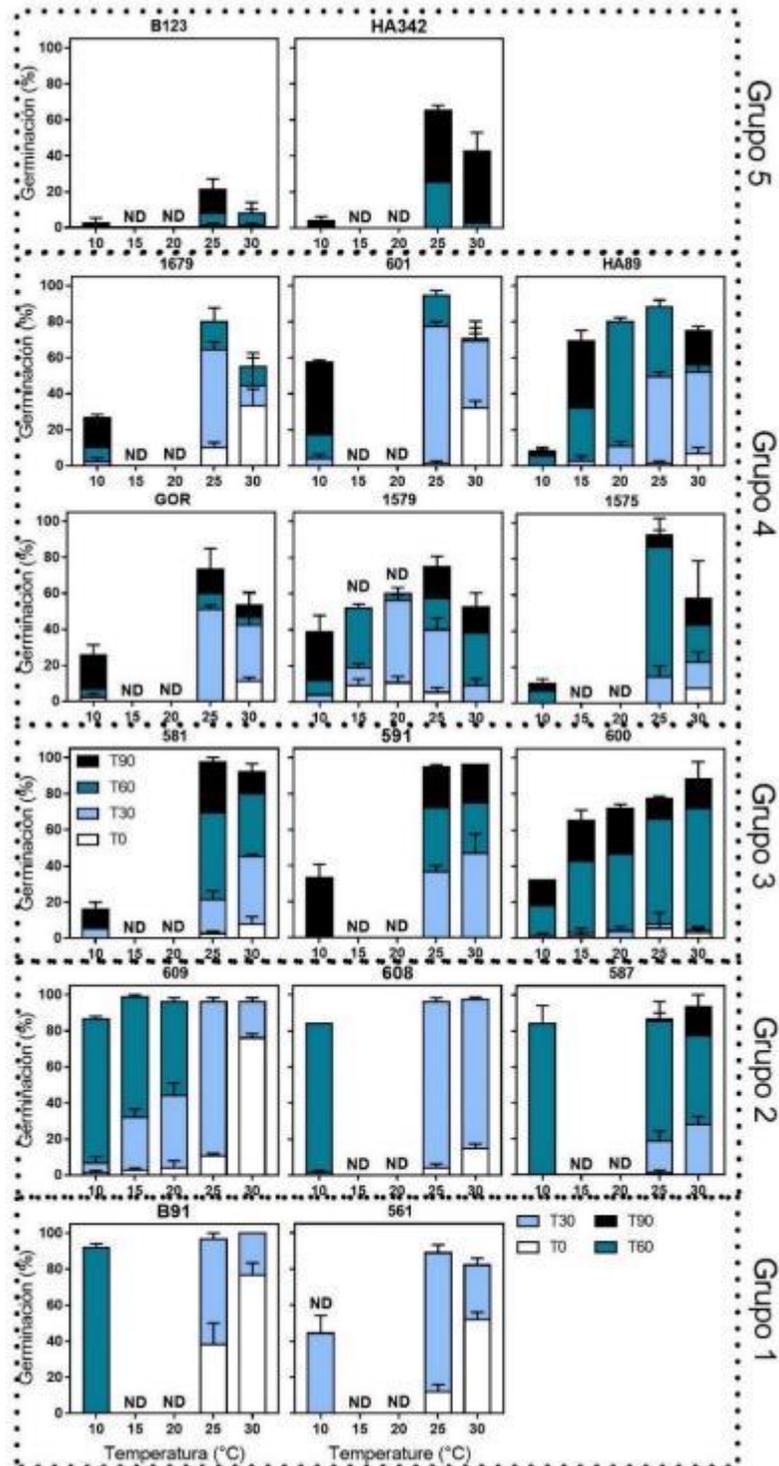


Fig. 2. 5. Germinación final acumulada (%) durante la postcosecha para distintas temperaturas de incubación (10 a 30°C). Los momentos postcosecha evaluados son 0 (barras blancas), 30 (barras celestes), 60 (barras azules) y 90 DDC (barras negras). Cada subFig. representa un genotipo. Los rectángulos con líneas punteadas negras representan el grupo al que pertenece cada genotipo según el AC del experimento 2. Cada barra representa la media \pm su EE (n=3).

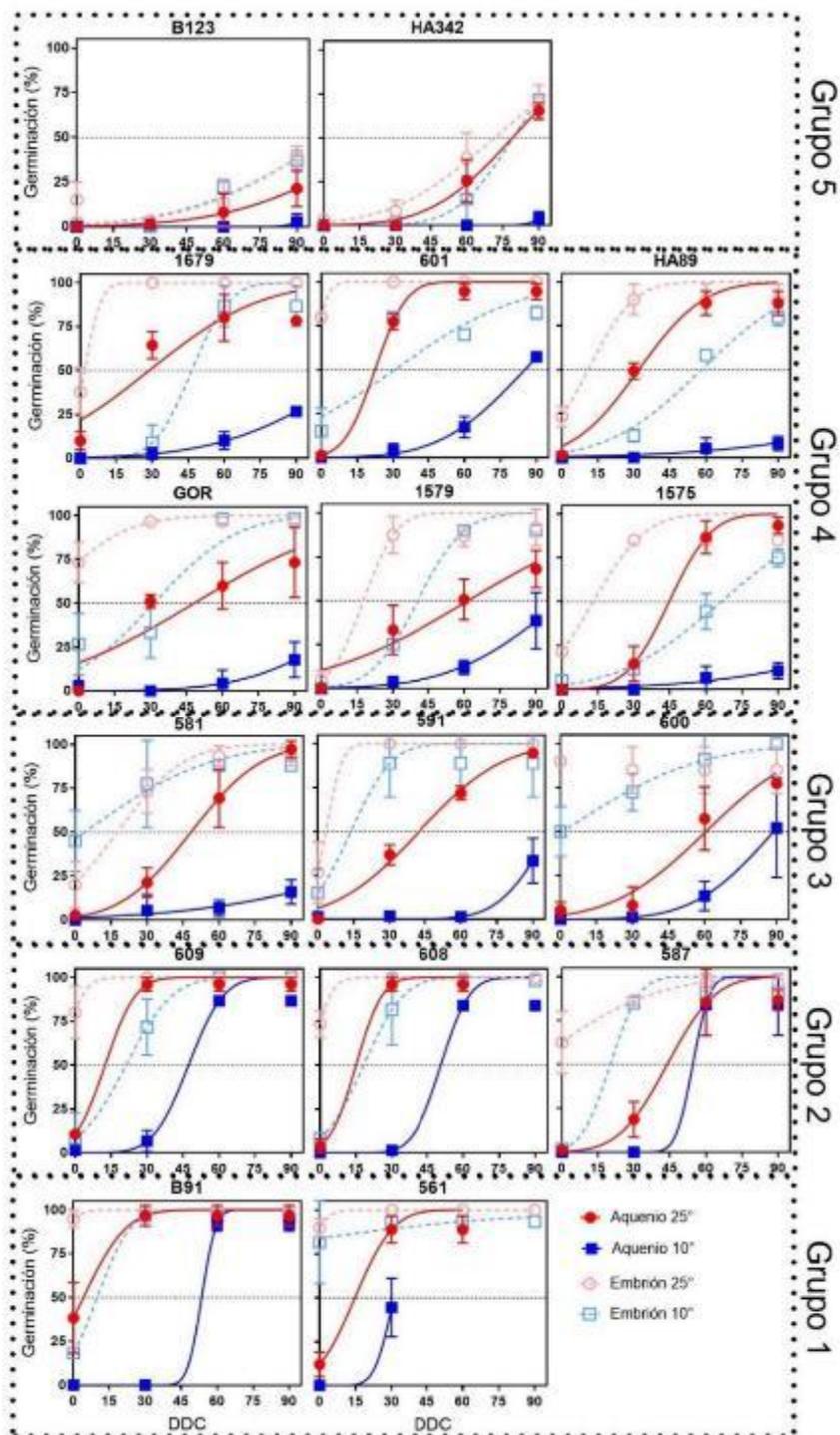


Fig. 2. 6. Germinación final (%) en función de los DDC para aquenios incubados a 25°C (líneas y círculos llenos rojos) y a 10°C (líneas y cuadrados llenos azules), y para embriones incubados a 25°C (línea punteada y círculos vacíos rosas) y a 10°C (línea punteada y cuadrados vacíos celestes). Cada Fig. representa un genotipo y los recuadros punteados los grupos obtenidos mediante el AC del *experimento 2*. Cada punto representa la media \pm su EE (n=3).

2.3.3. Modelos de germinación en genotipos representativos de los grupos de dormición.

Para ilustrar la superposición de los posibles mecanismos involucrados en la expresión de la dormición (DEBT y TI) se ajustaron modelos matemáticos a los datos de germinación de tres genotipos pertenecientes a diferentes grupos de dormición encontrados en el *experimento 1* (girasol silvestre con alta TI -AAL-, y girasol cultivado con TI -1579- y sin TI -609-; Fig. 2.7, 2.8). El modelo asumió que las semillas pueden germinar entre una temperatura límite inferior - $T_i(50)$ - y una superior - $T_s(50)$ - que definen el rango térmico permisivo para la germinación o, de otra forma, el rango dentro del cual no se expresa la dormición.

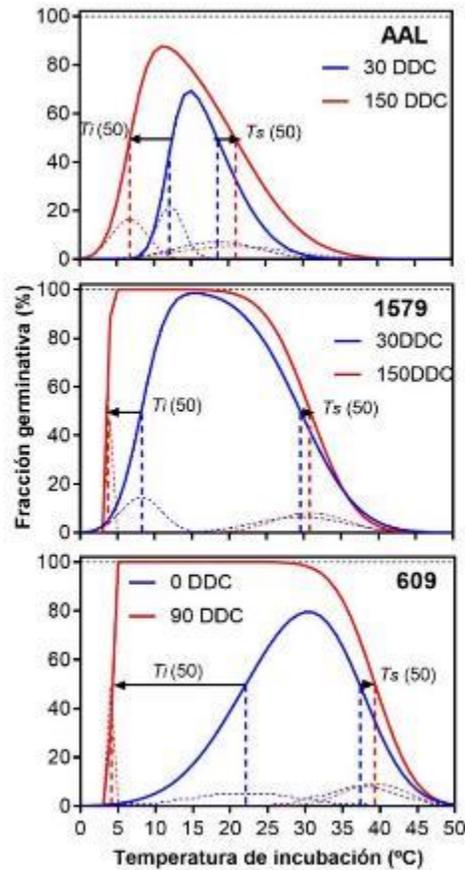


Fig. 2. 7. Modelado de la fracción germinativa (línea llena) de la población de aquenios en el rango térmico de incubación para diferentes genotipos del *experimento 1* (AAL, silvestre; 1579, cultivado con TI; 609, cultivado sin TI). Se ven representadas dos situaciones: niveles intermedios (0/30 DDC, líneas azules) y bajos de dormición (90/150 DDC, líneas rojas). Los valores de la temperatura media del límite inferior [$T_i(50)$] y la temperatura media del límite superior [$T_s(50)$] se muestran con líneas punteadas verticales y los desvíos estándar (σ) como la amplitud de la "campana" (curvas punteadas). El modelo se elaboró a partir de la metodología sugerida por Batlla y Benech-Arnold (2015), Washitani (1987).

Para los tres genotipos, la atenuación de la DEBT durante el almacenaje postcosecha se observó como un desplazamiento de la $T_i(50)$ hacia temperaturas más bajas, comparando las curvas de niveles intermedios (0/30 DDC) y bajos de dormición (90/150 DDC). En aquellos genotipos con una mayor expresión de la TI, se observaron valores menores de la $T_s(50)$ (p. ej. en 39,3, 30,8 y 20,9°C para 609, 1579 y AAL, respectivamente) y a la vez casi no hubo variación durante el almacenaje postcosecha (Cuadro 2.2). Cabe señalar que, en todos los genotipos al disminuir los niveles de dormición durante la postcosecha, se amplificó el intervalo de temperaturas permisibles para la germinación -intervalo $T_i(50)/T_s(50)$ -. Sin

Cuadro 2. 2. Parámetros calculados de los modelos (Fig. 2.9 y 2.10) para tres genotipos del *experimento 1* (AAL, 1579 y 609) para dos niveles de dormición (alto – 0 o 30 DDC- y bajo – 90 o 150 DDC-). Temperatura base para la germinación de achenios (T_b), tiempo térmico para la germinación (TT) y su desviación estándar (σ_{TT}), temperatura media del límite inferior [$T_i(50)$] y su desviación estándar (σ_{Ti}), temperatura media del límite superior [$T_s(50)$] y su desviación estándar (σ_{Ts}), raíz del error cuadrático medio (RECM) para la germinación de achenios (G.) y para la temperatura límite inferior/superior (T_i y $T_s(50)$), y finalmente los coeficientes de determinación (R^2) para cada temperatura de incubación (10, 15, 20, 25, 30°C) y del modelo general.

Parámetros	AAL		1579		609	
	30	150	30	150	0	90
T_b	0,8	0,8	3,2	3,2	3,4	3,4
TT	123,4	97,2	49,7	41,7	43,5	28,4
σ_{TT}	44,7	26,2	19,9	16,7	17,4	11,4
$T_i(50)$	12,1	6,7	8,2	3,8	22,1	4,1
σ_{Ti}	1,8	2,4	2,7	0,2	7,4	0,3
$T_s(50)$	18,5	20,9	29,5	30,8	37,4	39,3
σ_{Ts}	5,6	7,5	6,1	4,8	5,0	4,3
RECM G.	20,2	18,2	46,6	58,2	24,3	51,8
RECM T_i y $T_s(50)$	45,0	12,4	115,4	142,0	36,9	65,6
R^2 -10°	0,985	0,999	0,998	0,998	-	0,994
R^2 -15°	1,000	0,998	0,992	0,962	0,986	0,978
R^2 -20°	0,950	0,971	1,000	0,983	0,964	0,988
R^2 -25°	0,809	1,000	0,996	1,000	0,990	1,000
R^2 -30°	0,321	1,000	0,985	0,980	0,999	0,998
R^2 -Modelo	0,998	0,998	0,997	0,994	0,995	0,996

embargo, el rango de temperaturas permisivas para la germinación en el girasol silvestre AAL fue más estrecho que en girasoles cultivados con TI (1579) y menor aun con respecto a aquellos sin TI (609). Finalmente, durante la atenuación de la dormición, la velocidad y sincronización de la germinación aumentaron (visto a través de una disminución del tiempo térmico -TT- y de la desviación estándar - σ TT-, Cuadro 2.2). La variabilidad intraespecífica de los parámetros de TT para alcanzar el 50% de germinación fue evidente, donde los

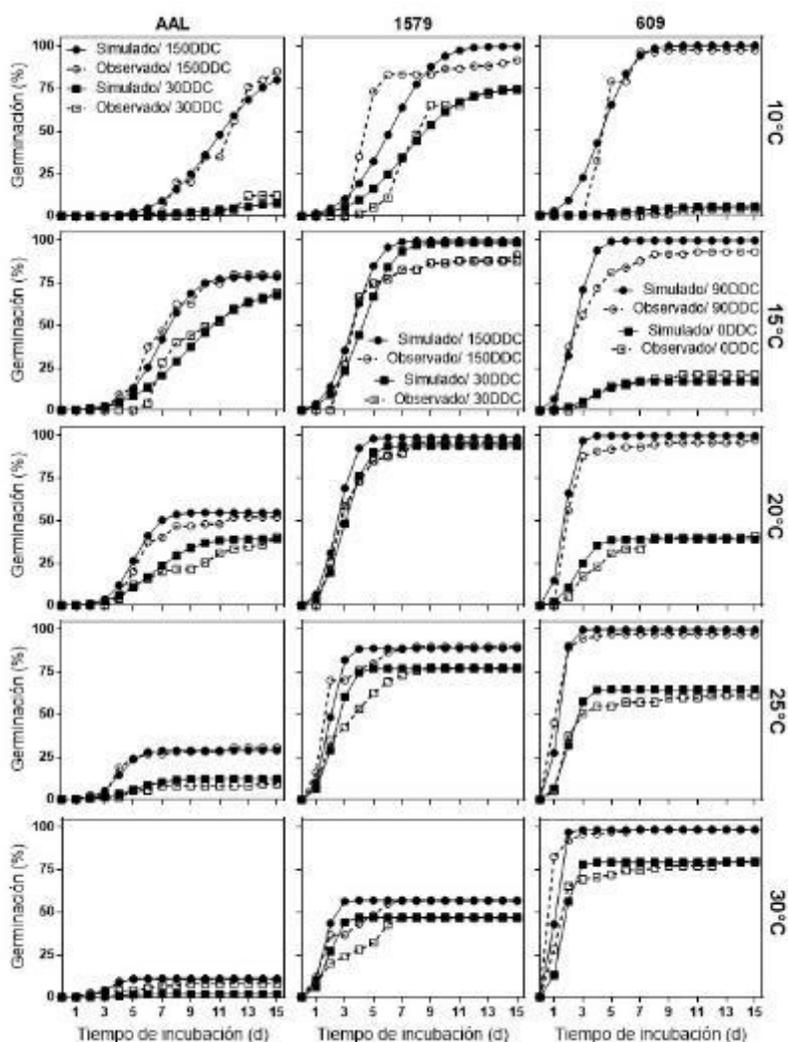


Fig. 2. 8. Evolución del porcentaje acumulado de germinación de aquenios en función del tiempo de incubación (d) para tres genotipos del *experimento 1* (AAL, 1579 y 609). Se muestra la germinación simulada (símbolos llenos) y observada (símbolos vacíos) para frutos incubados a 10, 15, 20, 25 y 30°C y presentando niveles contrastantes de dormición (niveles intermedios -cuadrados- y bajos -círculos-) asociados con diferentes tiempos de almacenaje (0 y 90 DDC para el 609, y 30 y 150 DDC para 1579 y AAL).

genotipos cultivados (609, 1579) tendieron a tener un menor TT y mayor T_b que el genotipo silvestre (AAL).

2.4.3. Asociación entre la respuesta de la semilla al ABA con la DEBT y la TI en diferentes genotipos.

En el *experimento 3* se abordó un posible papel de la sensibilidad de la semilla (o embrión) al ABA en la respuesta germinativa de los aquenios, utilizando un conjunto de genotipos pertenecientes a los grupos de dormición 1, 2 y 3 del *experimento 1*. En términos generales, en todos los genotipos la germinación en agua de aquenios y semillas (sin pericarpio) aumentó con el tiempo de almacenaje, así como la germinación de semillas en ABA (Fig. 2.9). Las diferencias en la capacidad de respuesta al ABA entre genotipos fueron evidentes una vez que la germinación de semillas en agua llegó a su máximo (p. ej. 60 y 90 DDC). Las semillas de las líneas 600 y HA89 fueron menos sensibles al efecto del ABA a 30°C en

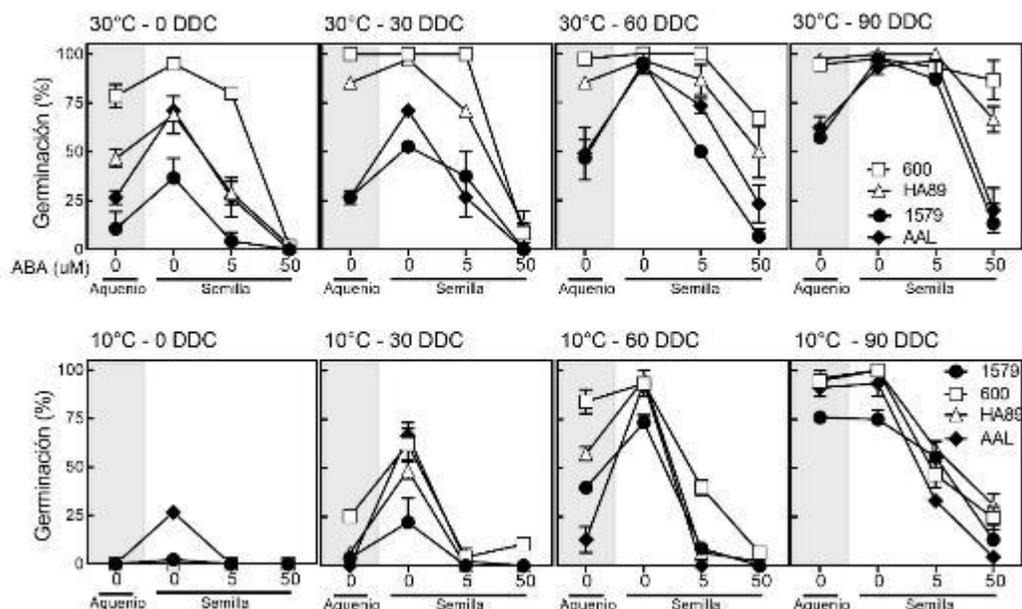


Fig. 2. 9. Respuesta a ABA exógeno para diferentes genotipos. AAL (silvestre, diamantes llenos), 1579 (cultivado con TI, círculos llenos), HA89 (cultivado, triángulos vacíos) y 600 (cultivado, cuadrados vacíos) del experimento 3 (ver dinámicas [Fig. S. 2.2](#)). Germinación de aquenios (fondo gris) y semillas en agua destilada, semillas en soluciones ABA 5 y 50 μM (a 10 y 30°C) a cosecha (0 DDC) y en diferentes tiempos durante el almacenaje postcosecha (30, 60 y 90 DDC). Cada punto representa la media ($n=3$) \pm su EE.

comparación con los genotipos 1579 y AAL, ambos con TI evidente (ver los valores de germinación de las semillas a 30°C en 50µM ABA, 90 DDC: las comparaciones múltiples de Tukey arrojaron letras "A" en 600 y HA89, y "B" en 1579 y AAL). Las diferencias entre genotipos para la germinación de aquenios a 10°C se observaron temporalmente a los 60 DDC, donde la germinación de aquenios tendió a asociarse con la capacidad germinativa de las semillas en ABA. Cabe señalar que la incubación con Flurocloridona no promovió la germinación de semillas en ninguno de estos genotipos, sugiriendo que la síntesis *de novo* de ABA no parece aportar a la diferente expresión de dormición en frutos maduros embebidos. Para expresar en términos cuantitativos la relación entre la capacidad de respuesta en semillas al ABA y la germinación de aquenios en diferentes tiempos de almacenaje en todos los genotipos, se realizó un análisis de correlación (Fig. 2.10) con los datos mostrados en la Fig. 2.9. Se encontraron correlaciones significativas entre la germinación del aquenio en agua y la germinación de la semilla en ABA 5 µM para los datos de 30 y 10°C ($r = 0,87^{****}$ y $0,90^{****}$ en las Fig. 10 A y B, respectivamente). El efecto de la temperatura de incubación en la respuesta de las semillas al ABA se ve como una mayor pendiente de la regresión lineal

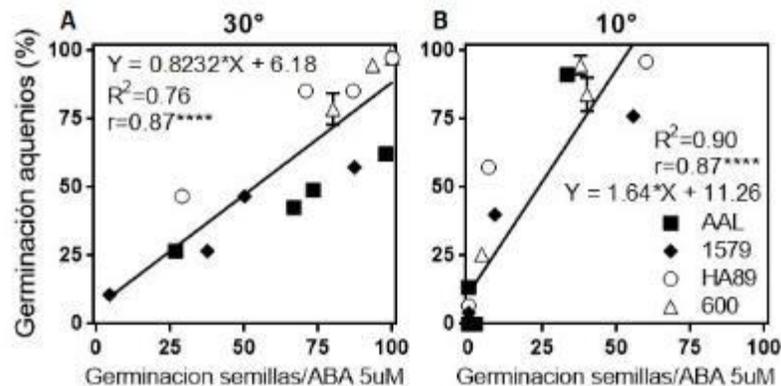


Fig. 2. 10. Asociación entre la germinación final de los aquenios y la germinación de semillas en ABA durante la cosecha y durante el almacenaje postcosecha, incubados a dos temperaturas (30 y 10°C; A y B, respectivamente). La incubación de las semillas corresponde a una solución de ABA con concentración 5 µM. Los genotipos analizados fueron AAL (cuadrados llenos), 1579 (diamantes llenos), HA89 (círculos vacíos) y 600 (triángulos vacíos) del experimento 3. Cada punto representa la media (n=3) y se muestra el factor de determinación (R^2) y correlación de Pearson (r ; $\alpha=0.05$).

a 10°C en comparación a 30°C (Fig. 2.10, A vs. B; test de pendientes $P < 0,20$). Estos resultados sugieren que las diferencias en la germinación de aquenios entre genotipos y durante la SD podrían deberse en parte a cambios en la sensibilidad del embrión al ABA endógeno. En general, las correlaciones que se muestran en las Fig.10 apoyan un papel de la sensibilidad del embrión al ABA en la restricción de la germinación del aquenio después de diferentes tiempos de almacenaje, a temperaturas de incubación contrastantes (10 y 30°C) y al comparar genotipos pertenecientes a diferentes grupos (fenotipos) de dormición. Los resultados también evidencian el papel de la sensibilidad del embrión (observado a través de las semillas) al ABA en la expresión de la TI, a pesar de que la TI es impuesta por el pericarpio (y asociado a ciertas características anatómicas de éste, como se verá en el Capítulo 3).

2.4. Discusión

Este capítulo exploró la variabilidad de distintos atributos de dormición en un conjunto de girasoles cultivados de diversos orígenes y algunas poblaciones o accesiones silvestres naturalizados en la región centro de Argentina. Tras ser cultivados bajo las mismas condiciones ambientales, la realización de análisis multivariados de variables que representan diversos caracteres de dormición (expresión en el rango térmico, contribución de las estructuras del aquenio, presencia de TI persistente) permitió agrupar genotipos y determinar fenotipos funcionales.

Los diferentes grupos de dormición obtenidos tras los *experimentos 1 y 2* reflejaron la existencia de dos mecanismos que afectan diferencialmente la germinación a diferentes temperaturas de incubación: la DEBT, común en todos los genotipos de girasol evaluados en este capítulo, y la TI, presente o ausente según el genotipo. Las variables de germinación

más informativas fueron las que mejor describieron cada uno de estos dos mecanismos relacionados con la dormición. Estas variables, relacionadas con los vectores del ACP en los *experimentos 1 y 2* (Fig. 2.1, 2.4), fueron la germinación de aquenios y embriones al momento de cosecha (inversamente relacionada con la profundidad de la dormición), T50 para aquenios y embriones (que refleja la persistencia de la dormición durante la postcosecha) y el patrón de respuesta de la germinación a lo largo del rango térmico (resumido por los vectores FTI.10.30 y FTI.25.30). Aunque en general los materiales con TI resultaron ser los de mayor DEBT, estas dos respuestas no están estrictamente correlacionadas y deben evaluarse individualmente. De acuerdo con esto, el fenotipado debe considerar la germinación a 10, 25 y 30°C. Este rango térmico incluye las temperaturas relevantes utilizadas en test de calidad de semillas (10°C, “Cold Test”, y 25°C, usualmente considerada como la temperatura óptima para girasol; ISTA, 1999), y también están dentro del rango de condiciones del ambiente para la siembra del cultivo del girasol (dependiendo de la ubicación geográfica y fecha de siembra utilizada). La importancia de ampliar el rango a 30°C se asocia con la posibilidad de poner en evidencia la TI, que puede presentarse en forma moderada (pero persistente) en los genotipos cultivados, en comparación con las poblaciones silvestres. Un bajo nivel de TI puede no parecer un problema si la germinación alcanzada a 25°C es alta (> 90%). Sin embargo, debería considerarse cuidadosamente teniendo en cuenta que este rasgo puede ser exacerbado por condiciones que promueven la hipoxia (como los tratamientos de recubrimiento de los aquenios -“curado”-, o la siembra en suelos excesivamente secos y/o húmedos y altas temperaturas; Huo y Bradford, 2015). Domínguez *et al.* (2019) trabajaron con una línea endocriadas y un híbrido comercial (ambos mostrando TI), y observaron que la incubación de embriones aislados a 30°C (que

germinaron completamente en agua) en condiciones de hipoxia inhibió la germinación. Esto sugiere que al menos parte del efecto inhibitorio del pericarpio está mediado por la limitación de la difusión de O₂ al embrión. La detección de esta propensión a la TI en un genotipo cultivado puede ayudar a diseñar protocolos de procesamiento para evitar condiciones que exacerben este carácter, así como prestar atención a los genotipos que presentan este carácter durante la etapa de mejoramiento. Nuestros resultados con semillas incubadas en ABA sugieren que la TI podría estar relacionada con una mayor señalización de ABA en el embrión (Fig. 2.9), aunque las características de la cubierta seminal y del pericarpio (dependientes principalmente del genotipo materno) también podrían tener un papel relevante. En el Capítulo 3 se indagará en forma más precisa la contribución del cigoto y de las cubiertas del aquenio.

Además de la contribución del genotipo al fenotipo de dormición, se sabe que el ambiente materno afecta profundamente a los caracteres de dormición en girasol, como reportaron por primera vez Bodrone *et al.* (2017), Lachabrouilli *et al.* (2021) y Riveira-Rubin *et al.* (2021). En este capítulo, los experimentos (1, 2 y 3) se sembraron en una fecha considerada como “temprana” dentro de la estación de crecimiento, y las variables ambientales indican que las condiciones meteorológicas fueron similares entre años ([Cuadro S. 2.1](#)). Las diferencias observadas en la radiación acumulada se debieron al retraso de la cosecha en el *experimento 1*, que puede explicar en parte los menores niveles de dormición al momento de cosecha en comparación con el *experimento 2*. Sin embargo, la mayoría de los genotipos en el *experimento 2* parecían tener mayores niveles de dormición en comparación con el *experimento 1*, más allá de este retraso en el momento de la cosecha. Este efecto "año" también hizo que algunos genotipos se agruparan de forma diferente entre experimentos. En

el *experimento 1*, la línea HA89 tuvo menores niveles de dormición (menor DEBT y sin TI) mientras que en el *experimento 2* tuvo una mayor DEBT y TI más marcada. Por lo tanto, es importante realizar el fenotipado en más de un año y/o ambiente. Sin embargo, el uso de diferentes fechas de siembra dentro de una misma campaña (como una forma de generar diferentes ambientes) debe ser considerado cuidadosamente, ya que las siembras tardías pueden reducir significativamente el nivel de dormición y el contraste entre genotipos (Riveira-Rubín *et al.*, 2021). Además, en el Capítulo 4 de esta tesis se resalta la importancia de la manipulación de las condiciones de los aquenios postcosecha, ya que el CH de los aquenios durante el almacenaje puede afectar en gran medida al proceso de post-maduración. El hecho de que la cosecha se retrasara en el *experimento 1* significó que los aquenios ya estaban lo suficientemente secos para post-madurar en el campo bajo condiciones no controladas.

El modelado de la respuesta de germinación a lo largo del rango térmico de incubación apoya que los patrones de respuesta aparentemente complejos para los diferentes genotipos pueden explicarse por el peso relativo de dos mecanismos que operan en ambos extremos del rango térmico (Fig. 2.7, 2.8). Para los tres genotipos se observó que, durante la post-maduración en seco, la $T_i(50)$ se desplazó varios grados hacia valores más bajos, como resultado de la atenuación de la DEBT. Este mecanismo parece ser común a todos los genotipos evaluados. Por otro lado, la $T_s(50)$ cambió comparativamente menos en postcosecha que la $T_i(50)$, reflejando el carácter “persistente” de la TI, pero fue muy diferente entre genotipos (casi 10°C menor en genotipos con TI intensa, como los silvestres). El rango de temperaturas permisivas para la germinación -intervalo $T_i(50)/T_s(50)$ - para el girasol silvestre AAL fue más estrecha que en los cultivados, y se corresponde con lo observado por Hernández *et al.*

(2019). Estos autores también han discutido la posible implicancia de los cambios en los atributos de dormición en respuesta a temperaturas del suelo más frías (visto a través del corrimiento de la $T_i(50)$ durante la post-maduración) lo que llevó a una rápida adaptación de los girasoles invasores en Argentina (Presotto *et al.*, 2020). La $T_s(50)$ tuvo cambios menores durante el almacenaje, resultando en valores más bajos en genotipos que presentaron TI (1579 y menor aun en AAL). Esto señala que TI es un carácter genotipo dependiente. Además, al disminuir los niveles de dormición durante el almacenaje, el intervalo de temperatura permisible para la germinación se amplió, la velocidad y la sincronidad de la germinación aumentaron (disminución TT y el σ_{TT} , Cuadro 2.2). La variabilidad intraespecífica de estos parámetros fue evidente (genotipos cultivados -609, 1579- presentaron un TT y σ_{TT} menor junto a una T_b mayor que el silvestre -AAL-).

La presencia de cierto grado de TI en los genotipos cultivados puede reflejar un carácter “silvestre” que permanece en genotipos con una menor historia de mejora, como en el 1579 (reconocido en la base de datos del GRIN del USDA -<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search>- como "poco mejorado" o “silvestre”). Cuando se compararon los girasoles silvestres y los cultivados en el *experimento 1*, se observó cierta asociación entre el contenido de aceite (un carácter importante en el mejoramiento de girasol) y la dormición ([Fig. S. 2.3 A](#)). Sin embargo, en ausencia de girasoles silvestres, el contenido de aceite (así como el peso seco de los aquenios) no se relacionó con la TI ni con ninguno de los atributos de dormición analizados en el *experimento 2* ([Fig. S. 2.3 B](#)). De hecho, ambos genotipos de "dormición extrema" 561 y HA342 tuvieron contenidos de aceite similares ($\approx 52\%$). Nuestros resultados sugieren que los caracteres de dormición "silvestre" persisten en las líneas endocriadas de girasol “élite”, mejoradas para un alto contenido en aceite, contribuyendo a

una alta variabilidad y una baja predictibilidad del fenotipo de dormición en los híbridos comerciales obtenidos a partir de estas líneas. Otra característica fue la asociación en ambos experimentos entre la dormición y el tiempo a floración de los distintos genotipos, evidencia ya observada en *Arabidopsis* y lechuga, entre otras especies (Ritland, 1983; Penfield y MacGregor, 2017; Auge *et al.*, 2019).

El papel central de la señalización del ABA en el embrión coincide con trabajos anteriores del grupo de trabajo (Bodrone *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018) donde la capacidad de respuesta del embrión al ABA también se relacionó con las diferencias en la dormición de los aquenios (según lo afectado por el ambiente materno o por la temperatura de almacenaje). En este capítulo se observó que las diferencias en dormición de los aquenios entre genotipos se asociaron con las variaciones en la capacidad de respuesta de la semilla al ABA (Fig. 2.9). Es así como la capacidad de respuesta de la semilla al ABA se relacionó positivamente con la germinación de los aquenios, afectada tanto por la DEBT como por la TI. Aunque la TI es impuesta sobre el embrión por parte de las cubiertas de los frutos (donde las semillas y embriones germinan completamente a 30°C, como observaron Domínguez *et al.*, 2019). Nuestros resultados apoyan que la TI implica una mayor sensibilidad del embrión al ABA, como observaron en lechuga Argyris *et al.* (2008). Las cubiertas del fruto aumentan la capacidad de respuesta del embrión al ABA endógeno y, aunque no se ha demostrado el mecanismo exacto, y diferentes trabajos apuntan a la restricción de los niveles de O₂ debajo de las cubiertas (Corbineau *et al.*, 1990; Rolletschek *et al.*, 2007, 2009; Dominguez *et al.*, 2019). La TI persistente impuesta por el pericarpio sugiere la participación de la hipoxia, fomentada por mayores tasas metabólicas y una menor solubilidad del O₂ en el agua a altas temperaturas de incubación. A pesar de que la respuesta del embrión al ABA es siempre más

marcada a bajas temperaturas de incubación (DEBT) que, a altas, y el O₂ podría ser menos limitante a bajas temperaturas sin tener alguna injerencia en la respuesta de germinación. La expresión de la dormición a lo largo del rango térmico, por lo tanto, puede ser el resultado de una disminución de la capacidad de respuesta del embrión al ABA desde temperaturas de incubación más bajas a más altas, en conjunto a un aumento de la señalización de ABA por aumento de los niveles de hipoxia (generada indirectamente por altas temperaturas en combinación con las cubiertas del fruto). Este posible mecanismo será indagado en mayor detalle en el Capítulo 3 de esta tesis sobre un menor número de genotipos cultivados.

2.5. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo muestran que hay una considerable variabilidad genotípica para los atributos de dormición en girasol. Todos los genotipos, silvestres y cultivados, muestran grados variables de DEBT, sin embargo, la TI puede presentarse en girasoles silvestres y algunos materiales cultivados. Las diferencias en la intensidad de DEBT y TI entre genotipos parece relacionarse positivamente con la respuesta del embrión al ABA. Estos resultados destacan el papel del embrión en el control de la respuesta de germinación del aquenio.

Capítulo 3:

Herencia de la dormición y termo-inhibición en aquenios híbridos de girasol. Estudio del rol de las cubiertas y del cigoto en estas respuestas.

Resumen

En este capítulo se abordó el estudio de la herencia de la DEBT y de la TI en aquenios híbridos de girasol. La dormición del aquenio puede deberse a un bloqueo en el embrión y/o a un efecto restrictivo sobre el embrión por parte de las cubiertas que lo rodean. El aporte genético de cada parental a los componentes del fruto (embrión o cubiertas) será diferente según el rol en la cruce y podría tener implicancias en el fenotipo de dormición de la F1. Esto se investigó realizando cruzamientos recíprocos utilizando tres líneas endocriadas aceiteras (1579, HA342, B123) con niveles intermedios-altos de DEBT y con TI, y una línea con baja DEBT y sin TI (609). Para los parentales y los híbridos se evaluó germinación de aquenios, semillas y embriones al momento de cosecha y en postcosecha, a 10 y 30°C, y la respuesta a hormonas e inhibidores. Las diferencias entre genotipos para la DEBT se asociaron con diferentes T_{50} principalmente a 30°C, y la TI se asoció con el máximo valor de germinación a 30°C alcanzado durante el almacenaje. Los resultados apoyan una herencia mixta, de origen nuclear con dominancia incompleta para la DEBT, y una herencia combinada -nuclear y materna (a través de las cubiertas)- para la TI. La herencia de TI en la F1 se observó solamente en los cruzamientos donde la madre fue uno de los parentales con mayor dormición (de acuerdo con mayores T_{50} de aquenios y embriones, mayor sensibilidad a ABA y menor respuesta a GA y etefón) y con características morfológicas del pericarpio (mayor espesor y esclerosamiento del parénquima medio) que sugieren una menor permeabilidad de este al intercambio gaseoso. La sensibilidad al ABA fue exacerbada por la hipoxia a 30°C, apoyando el rol del pericarpio en la inhibición de la germinación a través de

esta vía hormonal. Por otro lado, los niveles endógenos de ABA en el embrión durante el desarrollo no se asociaron con los niveles de dormición. Al momento de cosecha, los niveles de ABA se asociaron inversamente con el nivel de dormición de los parentales, sugiriendo una posible regulación negativa del metabolismo de ABA por su propia vía de señalización. Esto resalta la importancia de los cambios en la sensibilidad al ABA en la expresión de distintos niveles de dormición y de la TI, y un rol secundario del metabolismo de esta hormona.

3.1. Introducción

La dormición de las semillas o frutos es un carácter cuantitativo gobernado por múltiples genes, y su herencia es compleja debido a que involucra tejidos y órganos de diversa composición genética de los parentales (Hilhorst, 1995; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Por ejemplo, el aquenio de girasol está compuesto por estructuras o tejidos que varían en su dotación genética: el embrión es diploide ($1♀:1♂$), el endosperma es triploide ($2♀:1♂$), y tanto la testa como el pericarpio son diploides, pero de origen exclusivamente materno ($2♀$, derivan del ovario y receptáculo de la flor; Boesewinkel y Bouman, 1995). Dependiendo de la participación de las distintas estructuras en la dormición del aquenio se definirán las vías de herencia (materna o nuclear/cigótica) para la dormición en la progenie (ver Fig. 3.1). La herencia materna puede resultar de la prevalencia del genotipo materno en las cubiertas, y/o de una herencia extra cromosómica asociada a factores citoplasmáticos (ADN de las organelas) que también son heredados exclusivamente por vía materna (y en este caso pueden afectar el fenotipo del embrión; Foley y Fennimore, 2008; Roach y Wulff, 1987; Wolf y Wade, 2009). Es importante separar estos conceptos de “herencia materna” de los llamados “efectos maternos” que son aquellos asociados con el ambiente percibido por la planta madre (p. ej. radiación, temperatura, fotoperiodo) y por los frutos durante su desarrollo y que modifican de alguna manera atributos de la progenie (Penfield y MacGregor, 2017).

Trabajos previos apoyan distintas vías de herencia para el carácter dormición y reflejan la importancia relativa de diferentes estructuras en el control de la dormición, las cuales varían entre especies. La herencia por vía materna se observó en varias especies donde la dormición está impuesta por las cubiertas de la semilla (o del fruto), como *Arabidopsis* (Fedi *et al.*,

2017; Piskurewicz *et al.*, 2016; Tamura *et al.*, 2006), arveja (Garbutt y Witcombe, 1986), petunia (Girard, 1990) y también en girasol silvestre (Brunick, 2007; Hernández *et al.*, 2017; Pace *et al.*, 2015; Weiss *et al.*, 2013). *Arabidopsis*, p. ej., es un claro caso de dormición impuesta por las cubiertas, con un aporte relevante de la testa y del endosperma. En semillas dormidas o con TI, la fina capa de endosperma reprime el crecimiento del embrión a través de la síntesis y transporte de ABA al embrión (Debeaujon *et al.*, 2000; Bethke *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015). Este proceso requiere también de la presencia de una testa pigmentada y de una cutícula suberizada en la cara externa del endosperma, lo que posiblemente limita el ingreso de O₂ (Koorneef, 1981, 1990; Fedi *et al.*, 2017). En algunas especies (p.ej., lechuga o *Arabidopsis*), las células del endosperma micropilar tienen paredes de gran rigidez y su debilitamiento es necesario para completar la germinación (Sung *et al.*, 2008; Nambara *et al.*, 2010). El agregado de ABA inhibe la síntesis de las enzimas que actúan en la degradación de la pared celular (Groot y Karssen, 1992; Muller *et al.*, 2006). Tanto el metabolismo como la sensibilidad al ABA resulto ser un factor importante en la regulación de la TI en semillas de lechuga (Gonai *et al.*, 2004; Argiris *et al.*, 2008). El alto grado de esclerosamiento del pericarpio observado en girasoles silvestres también se asoció con la dormición por cubiertas predominante en estos materiales y en frutos híbridos derivados de cruza entre materiales silvestres y cultivados (Brunick, 2007; Hernandez *et al.*, 2017). Sin embargo, en girasol, se desconocen aún aspectos básicos del mecanismo involucrado en la regulación de la germinación por las cubiertas y su interacción con el componente embrionario. Algunos resultados sugieren que las cubiertas (endosperma + pericarpio) aumentan la sensibilidad del embrión al ABA al restringir la difusión de O₂ al embrión, sin alterar el metabolismo de ABA (Domínguez *et al.*, 2019). Sin embargo, esta

relación entre hipoxia y sensibilidad al ABA no se ha demostrado claramente aun en girasol y en relación con la DEBT y a la TI. En cuanto al rol del endosperma, no se ha evaluado si también contribuye a la inhibición de la germinación mediante la síntesis y transporte de ABA hacia el embrión como en *Arabidopsis*.

La influencia del parental materno sobre rasgos asociados con las cubiertas seminales puede deberse, además del balance cromosómico a favor del parental materno ($2♀:1♂$), a un mecanismo de regulación epigenética. Piskurewicz *et al.* (2016) demostraron en *Arabidopsis* la existencia de “*imprinting*” genómico en el endosperma, proceso que conduce a la expresión exclusiva de alelos de la madre, resultando en un fenotipo de dormición similar al del parental materno. Por otro lado, la dormición asociada al embrión podría estar definida por el genotipo del cigoto o herencia nuclear (con aportes equivalentes de ambos parentales); en este caso, la dominancia puede ser de tipo *completa* (la progenie se comporta como uno de los parentales), *incompleta* (el fenotipo de la progenie es intermedio a ambos parentales) o *codominancia* (los fenotipos de ambos parentales se expresan simultáneamente en la progenie; Miko, 2008) (ver esquema de tipos de herencia, Fig. 3.1). Algunos ejemplos de herencia nuclear fueron reportados en trigo (Lan *et al.*, 2005), arroz (Gu *et al.*, 2003) y lechuga (Eenink, 1981), donde el fenotipo de dormición dependió del genotipo del cigoto, y se correspondieron con una dominancia de tipo incompleta.

Trabajos previos en girasol (Presotto *et al.*, 2014; Weiss *et al.*, 2013; Seiler, 2007) investigaron la herencia de la dormición en frutos obtenidos a partir de la hibridación de girasoles cultivados y silvestres, dentro del contexto de la migración de genes hacia especies maleza. En genotipos cultivados, la selección se orientó en lograr un incremento del tamaño de la semilla, así como una germinación rápida y uniforme, en detrimento de los niveles de

dormición y espesor de las cubiertas (Hancock, 2012). Por un lado, Seiler (2007) y Brunick (2007) encontraron que la dormición profunda y prolongada en aquenios de varios genotipos silvestres está determinada exclusivamente por las cubiertas (sin dormición embrionaria). Weiss *et al.* (2013) y Hernández *et al.* (2017) observaron que la semilla híbrida presenta altos niveles de dormición semejantes al parental materno silvestre en un amplio rango de temperaturas de incubación (10, 20 y 30°C). Estos trabajos apoyan un rol protagónico de las cubiertas en la dormición del fruto, y la herencia por vía materna. La dormición por cubiertas característica de los girasoles silvestres parece estar presente (aunque más atenuada) en algunos genotipos cultivados con dormición extendida durante el almacenaje y con presencia parcial de TI. Sin embargo, dentro de los genotipos cultivados, la importancia relativa del aporte del embrión y de las cubiertas a la dormición del fruto puede variar enormemente (ver Capítulo 2). Debido a que el nivel de dormición del aquenio resulta de la interacción entre cubiertas y embrión, es aún difícil explicar el fenotipo de dormición que tendrá la progenie híbrida obtenida a partir de la cruce entre parentales con fenotipos de dormición contrastantes y según el rol de éstos en la cruce.

Los cruzamientos recíprocos constituyen una herramienta valiosa para investigar el aporte de las estructuras (embrión, endosperma y pericarpio) a la dormición del fruto a través de los patrones de herencia en la progenie (Johnson y Dhaliwal, 1976). La dormición del aquenio resulta de propiedades del embrión y de las cubiertas, así como de las interacciones entre estas estructuras, que a su vez son moduladas por el ambiente (por ej., fecha de siembra, temperatura; Bodrone *et al.*, 2017; Lachabrouilli *et al.*, 2021; Pizzorno, 2021; Riveira-Rubin *et al.*, 2021). Esta complejidad plantea un desafío para el estudio de los mecanismos involucrados, ya que muchas aproximaciones consideran el análisis de estos componentes

por separado, y la simulación de los efectos de uno sobre el otro. Por ejemplo, la incubación de embriones aislados en ABA o bajo hipoxia, son tratamientos que buscan recrear las posibles restricciones impuestas por las cubiertas (por ej., evitando la difusión del ABA,

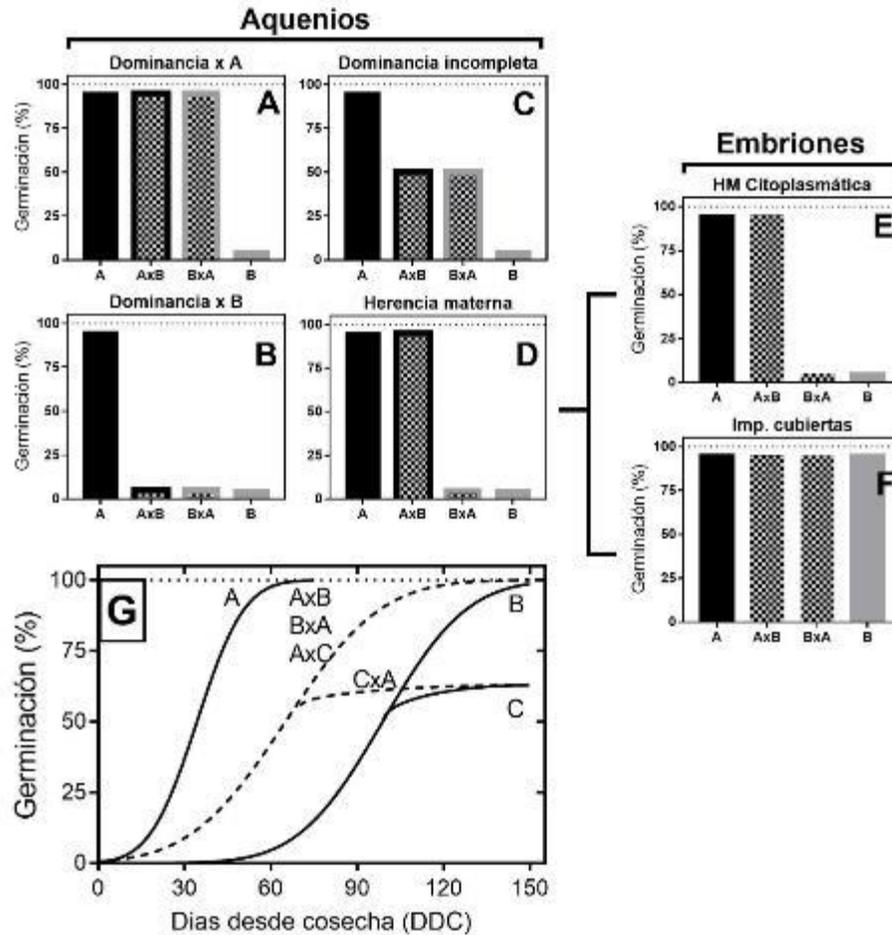


Fig. 3. 1. Esquema simplificado de tipos de herencia que pueden presentar los aquenios (A, B, C, D, G): Dominancia por alelos de un parental sobre el otro (A, B), dominancia incompleta (C) y herencia materna (D). En esta última, los embriones aislados pueden presentar dos tipos de fenotipos, (E) donde ambas cruas se asemejan al parental materno debido a herencia materna tipo citoplasmática o (F) que el comportamiento de los aquenios sea independiente al de los embriones (F). Finalmente se muestra un panel (G) con la dinámica de germinación de aquenios enteros durante la post-cosecha: genotipos de baja (A), alta dormición (B) y termo-inhibición (C) -en líneas llenas-. En caso de observarse dominancia completa ambas cruas se comportarían como uno de los parentales. Alternativamente en presencia de dominancia incompleta ambos híbridos serán idénticas e intermedias a los parentales (AxB, BxA) -líneas punteadas- y en caso de haber herencia materna, la crua se desplazaría hacia su parental materno (A y AxB, B y BxA). En caso de que la herencia materna se dé por efectos citoplasmáticos los embriones aislados de los híbridos deberían parecerse a su parental materno. En caso de que predomine una herencia materna asociada a las cubiertas (y no exclusivamente al embrión), los embriones deberían mostrar un fenotipo similar entre sí (pudiendo ser a la vez similar o intermedio a los parentales). Además, otro caso de presencia de termo-inhibición (herencia materna debido a cubiertas) y su expresión en el fenotipo de la crua (CxA).

limitando su catabolismo o aumentando su señalización). Debido a que el efecto restrictivo para la germinación del pericarpio de un genotipo determinado dependerá a su vez de la susceptibilidad del embrión a este efecto, una forma de ponderar los efectos de ambos factores es evaluando las cruzas recíprocas. En este caso, un mismo genotipo de embrión (híbrido) aparece combinado con cubiertas de uno u otro parental, ofreciendo un sistema experimental que permite evaluar el aporte relativo de las cubiertas y del cigoto en la respuesta del fruto entero. Esto, contribuiría a la comprensión de los mecanismos de dormición que se asocian a su vez con la variabilidad para este carácter en los girasoles cultivados. Así mismo, el conocimiento generado aportaría a la planificación de cruzamientos para la obtención de semilla híbrida con alto valor comercial.

En el presente trabajo se buscó (i) determinar el patrón de herencia para los caracteres que reflejan los mecanismos de dormición de frutos (DEBT y TI) evaluando el comportamiento de los híbridos F1 con respecto a ambos parentales (seleccionados por representar los grupos fenotípicos determinados en el Capítulo 2). Además, (ii) se buscó asociar los patrones de herencia encontrados con las distintas determinaciones fisiológicas (capacidad de respuesta a ABA, GA y Etefón, niveles endógenos de ABA, respuesta a la hipoxia durante la incubación) y estructurales/morfológicas (p. ej. tamaño y peso del aquenio, características anatómicas del pericarpio).

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Cultivo de parentales contrastantes y realización de cruzamientos recíprocos

En una instancia posterior, de acuerdo con los “fenotipos” de dormición encontrados en el Capítulo 2, se eligieron genotipos contrastantes, representativos de dichos grupos y se realizaron cruzamientos recíprocos (♀Ax♂B y ♀Bx♂A) con el fin de evaluar la herencia

del carácter. Los ensayos a campo se llevaron a cabo en el campo experimental de la Cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires durante la campaña 2017-2018 y 2018-2019 (*experimento 4 y 5* respectivamente, ver fenología en [Cuadro S. 3.1](#)). El cultivo se condujo bajo la misma metodología citada en el Capítulo 2 (ver *2.2.1. Material vegetal y experimentos a campo*). Los experimentos a campo se sembraron en micro parcelas (una por genotipo, asignada al azar en la parcela) de 8 hileras de 10-12 m cada una (Imagen 3.1).

Los genotipos cultivados en ambos experimentos fueron las líneas 609 (dormición baja-intermedia sin TI), 1579 (dormición intermedia-alta con TI), HA342 y B123 (cultivado con dormición alta y TI; solo en el *experimento 4*). Se realizó un escalonamiento de las fechas de siembra para sincronizar la fecha de floración (R5.1) entre los distintos genotipos (ver Imagen 3.1). La fenología de las plantas individuales se siguió de acuerdo con la escala de Schneiter y Miller (1981). En R4, se cubrió cada capítulo con una bolsa de poliamida semi-pesado para evitar la polinización cruzada entre los estados R5.1 y R5.9 (entre inicio de floración y 90% de flores en anthesis). Una vez alcanzado R5.1, en los individuos que se comportaron como madres se realizó la castración retirando las anteras (emasculación) diariamente utilizando pinzas curvas de precisión. Esta tarea se realizó al amanecer, recién emergidas las anteras previo a que se produzca su apertura y liberación del polen (debido a la emergencia de los estigmas). Los restos de polen de las anteras emasculadas se quitaron fácilmente con un rociador de agua. Vale la pena resaltar que la receptividad de los estigmas suele ser baja durante el primer día de su exposición, por lo cual la posibilidad de contaminación con el polen de la misma flor resulta ser casi nula (esto reduce la probabilidad de autopolinización). Habiendo alcanzado un 60% de la emasculación del capítulo se

procedió al calado, que consistió en retirar las flores centrales mediante una tijera y pinza de precisión para evitar que la posterior apertura floral de la región central contamine las anteras de las flores emasculadas los días previos. El calado se realizó también en las plantas que se comportaron como parentales puros (♀Ax♂A y ♀Bx♂B) para evitar distinta provisión de fotoasimilados por unidad de destinos (relación fuente/destino) que puedan influir en los niveles de dormición. Se recolectó polen en forma manual de las plantas seleccionadas como padres y se colocó en bolsas plásticas para luego almacenar a 4°C . La polinización se realizó en forma manual en dos instancias: cuando la castración del capítulo “madre” alcanzó el 30% y luego al 60% de las flores, evitando la pérdida de viabilidad y receptividad de los

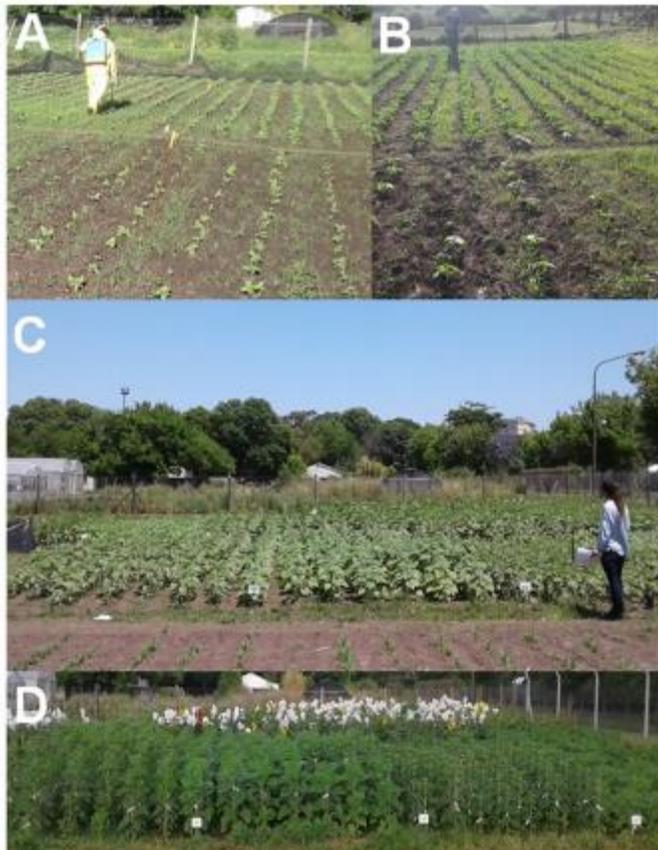


Imagen 3. 1. Labores culturales en el cultivo luego de la siembra manual de los parentales: (A) Protección química contra enfermedades y plagas, (B) Retiro manual de las malezas a través de zapín en el surco y/o rastra manual en el entresurco. También se siguió la evolución fenológica en cada individuo periódicamente desde R1-estrella visible- hasta R5.9 -90% de flores en antesis (C, D).

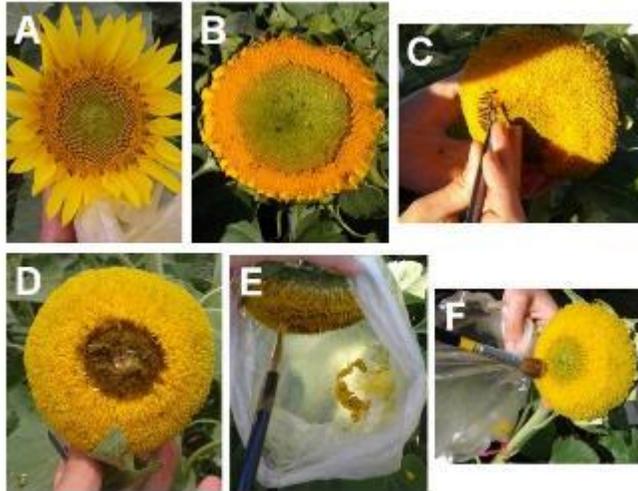


Imagen 3. 2. Secuencia de labores realizadas durante los cruzamientos entre parentales: (A) Comienzo de floración -R5.1- del capítulo, (B, C) emasculación del capítulo a través del retiro de las anteras emergidas durante cada día, (D) emasculación de las ultimas flores -60% del capítulo- y calado/retirado de las flores centrales, (E) colecta de polen y (F) polinización a través de pinceles con polen del genotipo objetivo.

estigmas (Imagen 3.2). Alcanzado el cuaje de los frutos, se realizó el monitoreo del CH para determinar el momento de madurez fisiológica (solo sobre las plantas que se comportaron como parentales puros) y de cosecha. Luego, se cosecharon los capítulos y se trillaron manualmente conservando los aquenios del tercio medio. El secado se realizó en secadoras experimentales a una temperatura de 35°C hasta lograr 6-7% de humedad (procedimiento de secado postcosecha utilizado por la industria semillera). Los aquenios se almacenaron en bolsas de papel, que a su vez se guardaron dentro de bolsas de plástico con cierre hermético a 25°C en una cámara con temperatura controlada.

3.2.2. Ensayos de germinación

Para los ensayos de germinación se seleccionaron plantas de cada genotipo (parentales e híbridos) que coincidieron en fenología y fecha de floración (R-5.1 ocurrió dentro de una ventana no mayor a 4-5 d). En los ensayos de germinación se incubaron 25 aquenios / semillas o 20 embriones por caja de Petri con doble papel de filtro y 6 ml de agua destilada (3 réplicas por tratamiento) por 15 d en cámaras con control de temperatura y se realizaron

recuentos periódicos (2-3 d) de germinación retirando las unidades germinadas, y agregando agua de ser necesario. Las pruebas se llevaron a cabo en distintos momentos durante el desarrollo (12-14, 26-27 d desde floración -DDF-), al momento de cosecha (una vez acondicionado) y durante el almacenaje para así seguir su dinámica de SD.

A. *Evaluación del nivel de dormición de los frutos y contribución de las distintas cubiertas y del embrión:* Se incubaron aquenios, semillas o embriones a temperaturas extremas dentro del rango térmico de incubación (10 y 30°C).

B. *Evaluación de sensibilidad de distintas estructuras a hormonas vegetales y distintos inhibidores de síntesis:* Se incubaron aquenios y embriones en agua destilada (tratamiento control) y combinaciones con distintas soluciones de hormonas (ABA, GA₃, etileno – p. ej. Etefón -, peróxido de hidrogeno -H₂O₂-) a distintas concentraciones y pruebas en combinación con distintos inhibidores de síntesis de hormonas (GAs, Trinexapac-etil; ABA, Fluridone; Etileno, CoCl₂). Se combinaron estos medios de incubación con temperaturas extremas dentro del rango térmico de incubación (10 y 30°C).

3.2.3. Determinación de ABA endógeno por radioinmunoanálisis

En el *experimento 4* se tomaron muestras de aquenios en desarrollo (12/14, 26 DDF), al momento de cosecha y en la postcosecha (150 DDC) para determinar niveles endógenos de ABA y también determinar diferencias en la capacidad de síntesis *de novo* durante la incubación. Para esto último, se incubaron aquenios en agua destilada y en Fluridone 100 µM. Se evaluó también un posible efecto del etileno en el metabolismo del ABA, incubando aquenios en etefón 50 µM. Luego de 24 h de incubación se retiraron las cubiertas, se disectaron los embriones y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, y luego se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Posteriormente las muestras se liofilizaron

(criodesecación al vacío), se pesaron y se molieron para la extracción acuosa de ABA. La cuantificación de los extractos de ABA se realizó por radioinmunoanálisis (Steinbach *et al.*, 1995) y los datos se expresaron en picogramos (pg) de ABA por gramo de peso seco de la muestra original.

3.2.4. Evaluación de la sensibilidad a hipoxia durante la incubación

Se evaluó la capacidad germinativa de aquenios y embriones bajo condiciones de hipoxia y normoxia (3% y 21% O₂). Las incubaciones se hicieron dentro de una cámara plástica semi-hermética (Model C-274, BioSpherix, New York), colocada dentro de una incubadora (con control de temperatura) y conectada a un controlador de O₂ (PRO-OX Model 110, BioSpherix, New York; Imagen 3.3). El mismo se conecta a un tubo de gas N₂ y este gas es inyectado a la cámara para mantener un nivel estable de O₂ (en este caso 3%). El uso de esta concentración de O₂ se basó en los resultados previos del grupo de trabajo para una línea e híbrido comercial (Domínguez *et al.*, 2019). La temperatura de incubación utilizada fue de 30°C, dado que en dichas condiciones se expresa la TI de los aquenios. Además, se evaluó la sensibilidad de embriones al ABA bajo dichas condiciones de hipoxia. *Ensayos de hipoxia*: Los embriones y aquenios se incubaron sobre papel de filtro colocado sobre una capa de algodón (2 cm de espesor aprox.) dentro de bandejas plásticas (9 cm de ancho x 6 cm de profundidad x 4 cm de alto). El algodón y papel se hidrataron con 55 ml de agua destilada o de diferentes concentraciones de ABA (0.5, 1, 5, 25 µM). Cada bandeja plástica contuvo 20 unidades (frutos o embriones) y se hicieron tres repeticiones (n=3). Al finalizar el período de incubación (7 d) se realizó un recuento de germinación. Cabe aclarar que las situaciones de hipoxia sobre los embriones simulaban una restricción al intercambio del gas

impuesto por el pericarpio y la cubierta seminal, mientras que el efecto buscado sobre los aquenios fue el de una doble restricción a la disponibilidad de O₂.



Imagen 3.3. (A) Cámara plástica semi-hermética donde se modifica la atmosfera gaseosa, por dentro cuenta con estantes para colocar las bandejas plásticas y externamente con un sensor controlador de O₂ y una manguera de entrada de gas, proveniente del regulador de flujo de gas, (B) regulador de flujo de gas y concentración de O₂ y (C) tubo de O₂ con su correspondiente reguladora de presión, conectado al regulador de flujo.

3.2.5. Caracterización anatómica y determinaciones sobre componentes morfológicos del aquenio

Para identificar y describir cambios en la estructura morfológica (grosor, número de capas celulares, células esclerificadas, etc.) del pericarpio de los frutos (Lindström *et al.*, 2007) en los parentales (609, 1579, HA342, B123) e híbridos recíprocos de aquenios al momento de cosecha. Las muestras fueron procesadas en el servicio de anatomía vegetal de la Cátedra de Botánica Agrícola de la FAUBA por la Ing. Agr. Mag. Anita Mantese. Se realizaron preparados histológicos siguiendo la metodología clásica de inclusión en parafina (Johansen, 1940). Las muestras se fijaron en la FAA durante 48 h, se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes, se clarificaron con xilol y finalmente se incluyeron en parafina pura. Luego se obtuvieron cortes seriados de 10-15 µm de espesor utilizando un microtomo rotativo de Minot. Finalmente, se tiñeron con la doble coloración de safranina fast-green que permite distinguir la pared celular primaria y secundaria y se realizó un ensamblaje definitivo

con el Bálsamo de Canadá. Se observaron los preparados histológicos y se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (Zeiss, Axioplan), y se contaron las capas de células del pericarpio (distinguiendo dentro del parénquima medio las células esclerosadas). Las mediciones del ancho del pericarpio se realizaron a partir de fotomicrografías digitales utilizando el programa Image Tool (Wilcox *et al.*, 2002). Para la caracterización de los tejidos (capas del pericarpio) se tuvieron en cuenta protocolos de trabajos sobre anatomía de frutos de asteráceas (Basak y Mukherjee, 2001; Pandey y Dhakal, 2001; Marzinek *et al.*, 2008; Cavaleri De-Paula *et al.*, 2013; Mantese *et al.*, 2006; Lindstrom *et al.*, 2007, 2015).

Además, se buscó describir la estructura morfológica de los componentes del aquenio de cada genotipo (parentales y sus híbridos). Dentro de las variables que se midieron fueron las dimensiones del aquenio al momento de cosecha (largo, ancho y espesor) sobre una muestra de 10 aquenios utilizando un calibre. Además, se midió el peso de cien aquenios (realizando triplicados), determinando luego el peso de la semilla y el pericarpio por separado (calculando luego la relación pericarpio/semilla).

3.2.6. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey (con $p \leq 0,05$) para el estudio de determinaciones de diferencias germinativas en tratamientos con inhibidores y agentes oxidantes e hipoxia, niveles endógenos de ABA, morfológicas del aquenio y anatomía del pericarpio utilizando el programa InfoStat 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2018) asistido por R Studio Statistics (Central Core R, 2017). Para las figuras se usó GraphPad Prism 7.0 (Motulsky, 2003). Para el análisis de correlaciones múltiples y ACP las variables de estudio se normalizaron y se realizaron utilizando el software R Studio Statistics y librerías anexas.

3.3. Resultados

3.3.1. Condiciones ambientales experimentadas por parentales e híbridos durante el desarrollo de los aquenios

En el *experimento 4*, debido a la buena sincronización de la floración de los 4 parentales utilizados, los frutos de los parentales y de los híbridos estuvieron expuestos a condiciones ambientales similares durante su desarrollo y la maduración ([Cuadro S. 3.1](#)). Las condiciones térmicas y de radiación medidas en la etapa antesis-madurez fisiológica (R5.5-R9) no difirieron significativamente entre genotipos, con rangos entre 25,0 - 25,3°C y 25,6 - 25,9 MJ/m². En el *experimento 5*, debido al retraso considerable de la fecha de siembra (40 d en promedio) la temperatura y radiación media descendió con respecto al *experimento 4* en el orden de 2,8°C y 5 MJ/m² en promedio. Además, se observaron desfases en el tiempo a floración en los parentales HA342 y 1579 con respecto a 609 (la fecha de floración ocurrió una semana más tarde) que llevó también a un atraso de los híbridos en los que se comportaron como madre en este parental. Tanto los parentales como los híbridos en los cuales se comportaron como madre HA342 y 1579 exploraron valores de temperatura y radiación media similares entres sí (22,9-23°C y 21,5-21,8 MJ/m² para HA342, y 21,7 y 19,8 MJ/m² para 609). Se podría concluir que los genotipos dentro de cada año de experimento exploraron condiciones ambientales similares por lo cual no se esperan efectos maternos diferenciales. Por otro lado, el *experimento 5* exploró un ambiente con menores temperaturas medias y menor radiación, lo que trajo una disminución de los niveles de dormición en todos los genotipos.

3.3.2. Caracterización de la dinámica de salida de la dormición (SD) en los parentales (experimento 4)

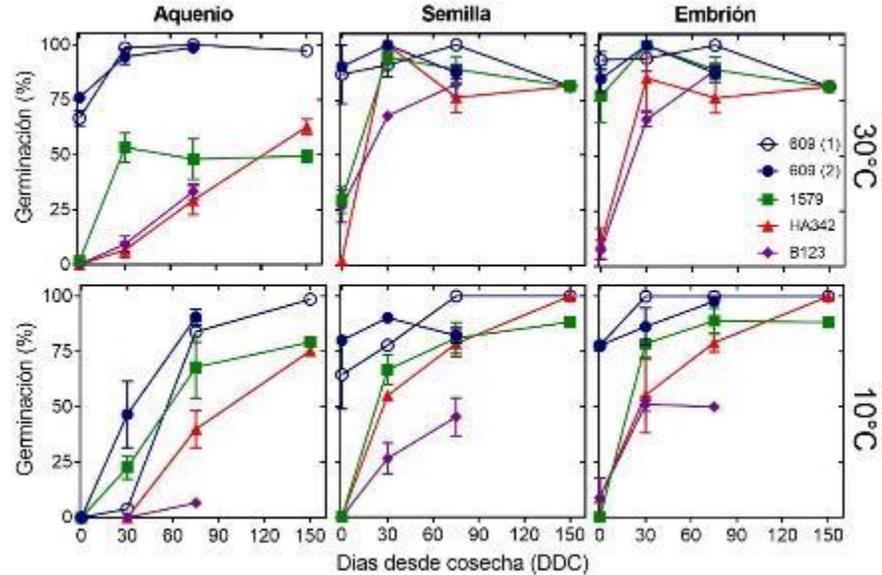


Fig. 3. 2. Evolución de la germinación final (%) durante la postcosecha (DDC) de los parentales 609 (círculos para dos fechas de floración 1 y 2), 1579 (cuadrados), HA342 (triángulos) y B123 (rombos). Se observa la germinación de aquenios, semillas y embriones (gráficos de izquierda a derecha) a dos temperaturas opuestas en el rango de incubación (10 y 30°C, panel superior e inferior respectivamente). Los datos corresponden al experimento 4 y cada punto representa la media \pm su EE (n=3).

En la Fig. 3.2 se muestra la evolución en el tiempo postcosecha del porcentaje final de germinación a 10 y a 30°C de incubación para los materiales usados como parentales. Se presentan los resultados para aquenios, semillas (sin pericarpio) y embriones. De acuerdo con las dinámicas de germinación en el almacenaje (T_{50} ; Cuadro 3.1), el material 609 mostró los menores niveles de dormición, y los materiales 1579, HA342 y B123 mostraron niveles de dormición crecientes. Estos materiales más dormidos además presentaron TI, que limitó la germinación máxima a 30°C avanzado el almacenaje. La comparación de la germinación de semillas (sin pericarpio) y embriones permite evaluar un posible efecto de la cubierta seminal en la dormición. Con excepción del genotipo 1579 y solo al momento de cosecha y a 30°C de incubación (donde la cubierta seminal inhibió la germinación con respecto a los embriones), ninguno de los genotipos exhibió un efecto relevante de la cubierta seminal en post-cosecha (la germinación de semillas y embriones fue similar entre sí).

Cuadro 3. 1. Tiempo en alcanzar el 50% de germinación durante el almacenaje postcosecha (T_{50}) en los parentales e híbridos en las distintas estructuras (aquenio, semilla, embrión) a 30 y 10°C de incubación. Las dinámicas se calcularon por extrapolación lineal en las dinámicas de la Fig. 3.3.

Genotipo	Aquenio		Semilla		Embrión	
	T50 30°	T50 10°	T50 30°	T50 10°	T50 30°	T50 10°
609	0,0	56,2	0,0	0,0	0,0	0,0
609x1579	16,0	49,0	0,0	19,7	0,0	13,4
1579x609	21,0	55,4	0,0	22,9	0,0	18,0
1579	31,7	57,4	9,6	31,0	0,0	18,5
609xHA342	21,6	56,2	4,0	14,5	0,0	5,0
HA342x609	25,4	56,2	7,0	16,6	0,0	10,0
HA342	122,0	97,6	14,7	26,6	15,3	27,3
609xB123	14,6	44,0	0,0	15,5	0,0	5,5
B123x609	29,0	70,3	0,0	21,2	0,0	5,5
B123	150,0	150,0	17,4	75,0	21,5	29,0

3.3.3. Germinación de los sistemas de cruzas al momento de cosecha y durante la postcosecha

A continuación, se presentan los resultados de los tres sistemas de cruzas (1579:609, HA342:609, B123:609) realizados en el *experimento 4* de esta tesis (Fig. 3.3).

3.3.3.1. *Sistema de cruzas 1579:609*

En la Fig. 3.3 A se muestran los resultados de la germinación final de aquenios, semillas y embriones a dos temperaturas de incubación (10 y 30°C), al momento de cosecha y en diferentes tiempos de almacenaje en postcosecha. Al momento de cosecha, la germinación de aquenios a 30°C fue nula para los híbridos y el parental 1579. Sin embargo, la germinación de semillas al momento de cosecha mostró que el nivel de dormición de los híbridos fue intermedio al de ambos parentales. Esto se ratificó posteriormente con la dinámica de germinación (a 30°C) de aquenios, semillas y embriones que fue similar entre híbridos, los cuales tendieron a presentar valores de T_{50} intermedios a ambos parentales (Cuadro 3.1). Esto apoya una dominancia incompleta de la dormición, sin dominancia de

1579 (a diferencia de lo que aparentaron los valores de aquenios al momento de cosecha). En cuanto a la TI, este rasgo se expresó solamente en el parental 1579 como la incapacidad de superar el 50-60% luego de los 30 DDC. La germinación de semillas y embriones de todos los genotipos alcanzó valores cercanos al 90%, tratándose de TI impuesta por el pericarpio en 1579, y la cual no fue heredada a la progenie híbrida.

La dinámica de germinación de aquenios a 10°C fue similar entre los dos parentales e híbridos (valores similares de T_{50}). Sin embargo, se observaron diferencias en los componentes de dormición del fruto, donde el parental 609 mostró menor dormición embrionaria (mayor germinación de embriones y semillas al momento de cosecha) en comparación a los híbridos y 1579; en estos materiales la dormición embrionaria se perdió gradualmente y con una T_{50} similar. Esto nuevamente sugiere que la dormición del aquenio está definida por el embrión y sigue una herencia nuclear.

3.3.3.2. Sistema de cruzas HA342:609 y B123:609

Estos siguieron patrones de herencia similares (Fig. 3.3. B, C), pero con particularidades sujetas a cada parental de alta dormición utilizado en el cruzamiento (Fig. 3.2). En el sistema de cruzas HA342:609 nuevamente la germinación a 30°C de aquenios de ambos híbridos recíprocos al momento de cosecha y durante una primera etapa del almacenaje fue similar entre sí (ver T_{50} , Cuadro 3.1). La germinación de aquenios híbridos al momento de cosecha fue similar al parental de mayor dormición, pero mostraron una mayor velocidad de SD durante la postcosecha (menor T_{50} con respecto a HA432). El parental HA342 al momento de cosecha presentó una alta dormición embrionaria, mientras la dormición de ambos híbridos estuvo impuesta por las cubiertas (alta germinación de semillas y embriones desde cosecha). La TI impuesta por el pericarpio en el parental HA342 se observó en la crusa

HA342x609, donde la germinación no superó el 60%-70% durante un almacenaje prolongado (150 DDC). En el híbrido 609xHA342 no se observó TI y la germinación fue

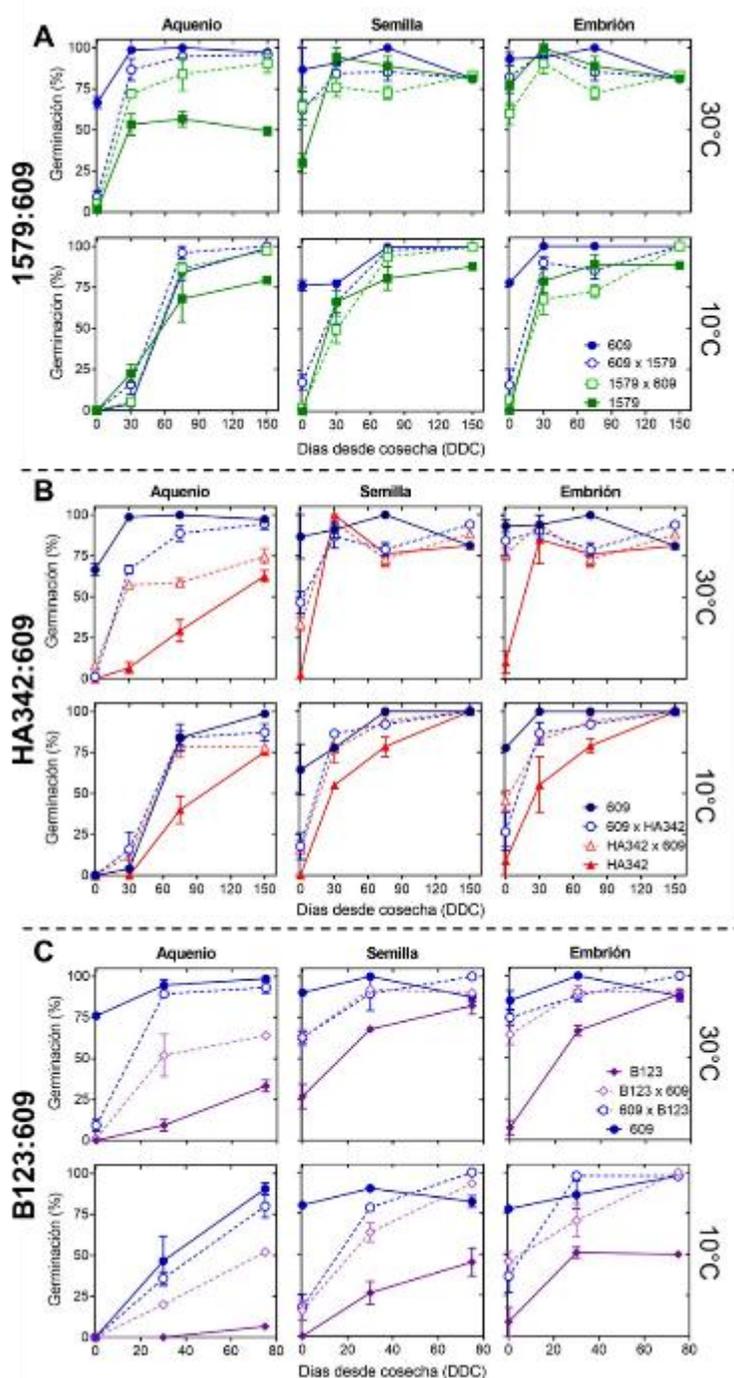


Fig. 3. 3. Evolución de la germinación final (%) durante la postcosecha (DDC) de los parentales e híbridos recíprocos sobre aquenios, semillas y embriones (gráficos de izquierda a derecha) a dos temperaturas opuestas en el rango de incubación (10 y 30°C, panel superior e inferior respectivamente). Se muestran los tres sistemas de cruza (A, 1579:609; B, HA342:609; C, HA342:609). Los datos corresponden al experimento 4 y cada punto representa la media \pm E.E. (n=3).

superior al 95% a los 75 DDC. Las diferencias entre genotipos fueron menos evidentes cuando se incubaron a 10°C. Los híbridos nuevamente se comportaron de manera similar entre sí en sus dinámicas de salida (T_{50}) las cuales fueron intermedias a los parentales.

En el sistema de cruzas B123:609 el patrón fue similar al presente en HA342, con la particularidad de que B123 presentó una dinámica aún más lenta de SD, sujeta a una alta dormición embrionaria expresada a 30 y a 10°C (mayor T_{50} que HA342). La particularidad de este sistema de cruzas fue que el efecto del genotipo materno sobre la progenie se dio tanto a alta como a baja temperatura de incubación. La inhibición por cubiertas se dio no solo a 30°C en la progenie híbrida al comportarse como madre, sino también a 10°C. Aun así, las semillas y embriones de ambas cruzas F1 siempre presentaron el mismo fenotipo e intermedio a sus parentales (independientemente de la temperatura de incubación) evidenciando la dependencia del genotipo del cigoto.

Las dinámicas observadas en el *experimento 5* sobre los sistemas de cruzas HA342:609 y 1579:609 ([Fig. S. 3.2](#) A, B) mostraron los mismos patrones en aquenios a alta temperatura de incubación al momento de cosecha. Los niveles de dormición al momento de cosecha y durante la postcosecha fueron menores que en el *experimento 4* debido a un efecto del ambiente materno (Riveira-Rubín *et al.*, 2021), asociado con el retraso considerable en la fecha de siembra (aproximadamente 40 días, ver [Cuadro S. 3.1](#)). El retraso en la fecha siembra afectó los niveles de dormición en mayor medida en los genotipos de dormición intermedia (1579) y alta (HA342). La pérdida de dormición de los parentales fue más rápida durante la postcosecha comparado al *experimento 4* y no se observó TI persistente. A 10° los patrones de SD fueron similares entre parentales y cruzas, incluso en el sistema de cruzas 1579:609 las tasas de salida se invirtieron entre parentales (609 presentó menor velocidad

de SD que 1579). En términos generales, la dormición del aqenio dependió fuertemente del genotipo del embrión, la cual estuvo definida por el cigoto con dominancia incompleta. Por lo tanto, no se observaron indicios de herencia extra nuclear (citoplasmática) en la dormición embrionaria. Sí se observó, en cambio, una herencia materna para la dormición impuesta por pericarpio asociada con la TI en las cruzas entre 609 con HA342 y B123. Para el caso de B123, la restricción impuesta por el pericarpio heredada por vía materna también se manifestó a 10°C. En las próximas secciones se profundizó en el fenotipado de los sistemas de cruza mediante ensayos de respuesta a hormonas (respuesta de los embriones al agregado de ABA, y de aqenios al agregado de GA y etefón).

3.3.4. Evaluación de la sensibilidad de los embriones al ABA en los sistemas de cruza.

En la Fig. 3.4 (A, B, C) se muestran los valores de germinación final para aqenios incubados en agua (a 30 y 10°C) y para embriones incubados a 30°C en agua, 5 y 50 µM ABA, o incubados a 10°C en agua, 1 y 5 µM ABA. Los ensayos se realizaron al momento de cosecha, y se repitieron a los 30 y 75 DDC. En los ensayos de cosecha y 30 DDC se agregó Fluridone (100 µM) en las incubaciones de embriones. La respuesta de los embriones aislados a la aplicación de ABA cayó durante la post-maduración (comparando cosecha vs. 30 DDC) en todos los genotipos (parentales e híbridos), independientemente del nivel de dormición que estos presentaron (Fig. 3.4 A, B, C). De acuerdo con los resultados presentados en el Capítulo 2, la inhibición de la germinación por ABA fue mayor a bajas temperaturas de incubación (10 vs 30°C), condición donde se expresó en mayor medida la dormición de los aqenios. A los 30 y 75 DDC se observaron diferencias en la sensibilidad al ABA entre genotipos; estas diferencias, que resultaron más claras a 30°C, se asociaron con los distintos niveles de DEBT

y TI. Por ejemplo, a los 75 DDC, el genotipo 1579 mostró una mayor inhibición por 5 μM ABA que el 609, y los híbridos mostraron una inhibición intermedia a los parentales.

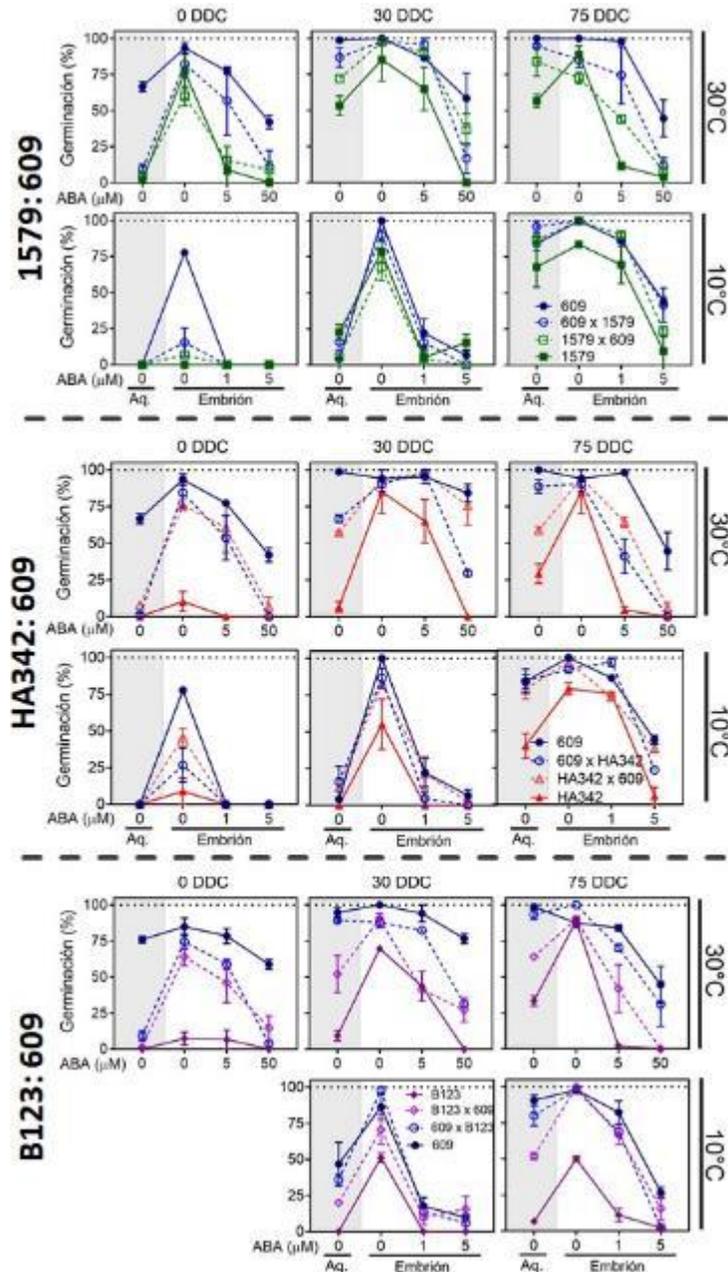


Fig. 3. 4. Respuesta a ABA exógeno para los parentales y sus cruza reciprocas sobre los 3 sistemas de cruza (A, 1579:609; B, 1579:609; C, HA342:609). Germinación final de aquenios (sombra gris) y embriones en agua destilada, y de embriones en soluciones de ABA 5 y 50 μM (a 30 $^{\circ}\text{C}$) y Fluridone + ABA 1, 5 μM (a 10 $^{\circ}\text{C}$) a cosecha (0 DDC) y durante la postcosecha (30 y 75 DDC). Para los ensayos de cosecha y 30 DDC, las incubaciones en ABA se combinaron con Fluridone 100 μM . A los 75 DDC las incubaciones en ABA no incluyeron Fluridone). Se muestran los tres sistemas de cruza (A, 1579:609; B, HA342:609; C, HA342:609). Los datos corresponden al *experimento 4* y cada punto representa la media \pm su EE (n=3).

Este patrón también se repitió en los sistemas de cruzas HA342:609 y B123:609 (Fig. 3.4 B). Desde cosecha, los embriones híbridos presentaron valores de germinación en ABA similares entre sí e intermedios a ambos parentales (p. ej., HA342:609 a los 75 DDC en ABA 5 μ M; y B123:609 en 50 μ M ABA a los 30 DDC). Las diferencias entre genotipos (parentales e híbridos) observadas a 10°C de incubación fueron menos evidentes que a 30°C, excepto para el sistema de cruzas B123:609 (Fig. 3.4 C). En este caso, se mantuvo el contraste entre los parentales a 10°C de incubación y los embriones híbridos tendieron a ser semejantes entre sí e intermedios a los parentales. En conjunto, estos resultados apoyan la herencia nuclear de tipo incompleta para la respuesta del embrión al ABA. En los ensayos de 75 DDC no se incluyó Fluridone al evaluar la germinación de embriones en ABA, observándose una caída en la germinación en ABA a 30°C con respecto al ensayo previo realizado a los 30 DDC. Esto sugiere un aporte de la síntesis endógena de ABA observable a través de la modificación del rango de concentraciones de respuesta al ABA exógeno. Este aporte de una síntesis endógena de ABA se hizo evidente en el *experimento 5*, donde se comparó la germinación de embriones en agua y en Fluridone.

En el *experimento 5*, nuevamente se evaluaron los patrones de herencia de la dormición de aquenios y la sensibilidad de embriones al ABA. Sin embargo, para los tres parentales e híbridos evaluados se observaron menores niveles de dormición de aquenios y una menor capacidad de respuesta a ABA, tanto al momento de cosecha como durante postcosecha ([Fig. S. 3.3](#)). A diferencia del *experimento 4*, el Fluridone logró aumentar la germinación de embriones con respecto a su control en agua al momento de cosecha en los tres genotipos evaluados (609, 1579 y HA342).

3.3.5. Respuesta de los aqenios a la aplicación de GA y etefón en los sistemas de cruas.

En los materiales del *experimento 4* se evaluó la respuesta de aqenios a aplicaciones GA y un dador de etileno (etefón). Se observaron diferencias entre genotipos al momento de cosecha, así como en la post-maduración (Fig. 3.5 A, B, C y en el *experimento 5*, [Fig. S. 3.4](#)). La respuesta a GA y etefón (y las diferencias entre parentales) fue mayor en la incubación a 30°C comparando con la incubación a 10°C. De acuerdo con la sensibilidad de aqenios a GA y etefón al momento de cosecha, los parentales siguieron el ordenamiento de los fenotipos de dormición establecidos previamente (609>1579>HA342>B123). La promoción de la germinación generalmente fue mayor en respuesta al agregado de 50 µM etefón comparando con GA₃ 100 µM (Fig. 3.5 A, B, C).

En el sistema de cruas de 1579:609, los híbridos recíprocos fueron similares entre sí (reflejando la importancia del cigoto), y alcanzaron altos valores de germinación en etefón 50 µM desde cosecha (Fig. 3.5 A; ensayo 0 DDC). La TI observada en el parental 1579 fue removida por la incubación en etefón más avanzado el almacenaje (75 DDC). Por otro lado, la TI observada en los híbridos HA342x609 y B123x609 no se logró revertir con la incubación en GA₃ o etefón (aun luego de 75 DDC), a diferencia de los híbridos recíprocos en cada caso (609xHA342 y 609xB123) que sí alcanzaron altos valores de germinación con 50 µM etefón desde cosecha (Fig. 3.5 B y C, ambos a 30°C). Esto refleja una inhibición por cubiertas más intensa establecida por los parentales HA342 y B123, en comparación con el 1579. En el caso del híbrido B123x609, esta inhibición por cubiertas de la madre B123 se expresó tanto a 30 como a 10°C de incubación, mientras que en HA342 a 10°C este efecto estuvo más atenuado y solo se expresó a 30°C. Esto sugiere que las cubiertas del B123 tienen un efecto inhibitorio adicional al de los otros parentales evaluados.

3.3.6. Evaluación del rol de las hormonas ABA, etileno y GA en la expresión de la dormición, y regulación de estas vías hormonales por la hipoxia

En esta sección se buscó profundizar en los mecanismos hormonales que regulan la dormición, y su posible regulación por las cubiertas a través de la restricción de los niveles

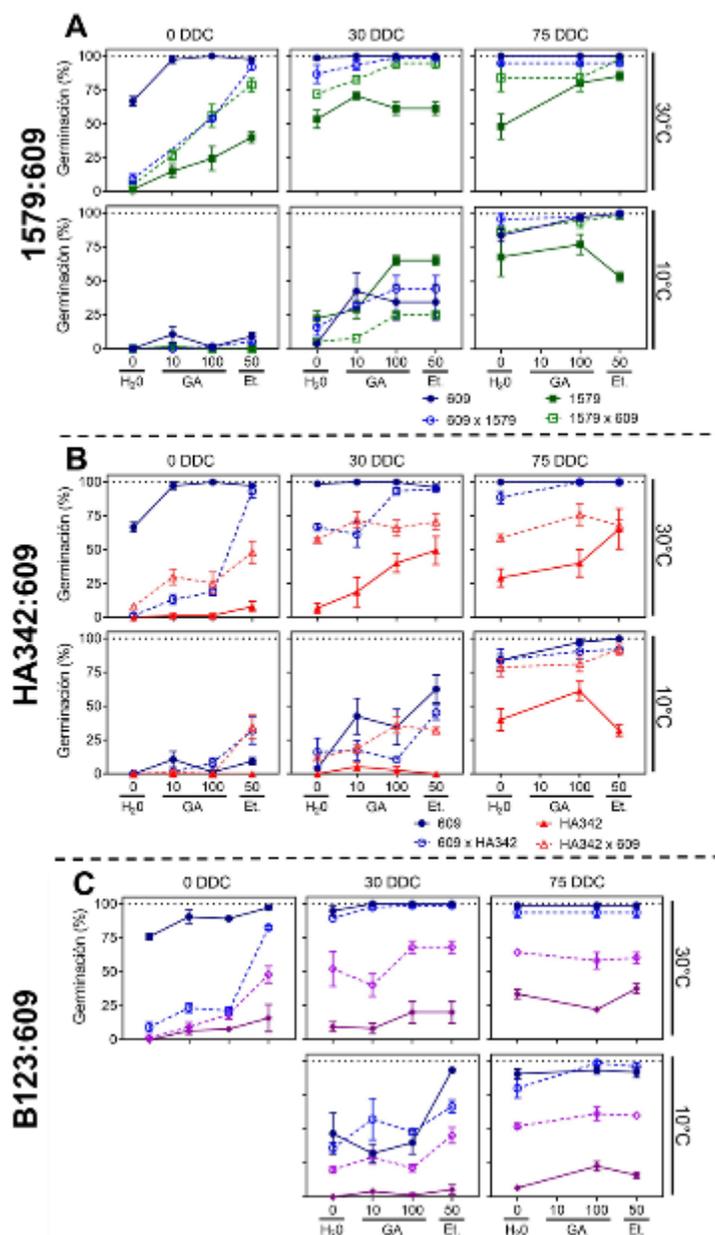


Fig. 3. 5. Respuesta a GA₃ y etefón exógeno en los parentales y sus cruza recíprocas sobre los 3 sistemas de cruza (A, 1579:609; B, 1579:609; C, HA342:609). Germinación de aquenios en agua destilada y soluciones de GA₃ 10 y 100 μM y etefón 50 μM, incubados a 30 y 10°C al momento de cosecha (0 DDC) y durante la postcosecha (30 y 75 DDC). Se muestran los tres sistemas de cruza (A, 1579:609; B, HA342:609; C, HA342:609). Los datos corresponden al *experimento 4* y cada punto representa la media ± su EE (n=3).

de oxígeno. Los ensayos se llevaron a cabo en tres de los genotipos usados como parentales en este capítulo (609, 1579 y HA342) y, a partir de los resultados más relevantes, se realizaron determinaciones en algunas de las cruzas.

3.3.6.1. Niveles endógenos de ABA y su relación con el nivel de dormición

Para los tres parentales (609, 1579, HA342, en el *experimento 4*), se determinó el contenido de ABA en ejes de embriones. Estos se diseccionaron a partir de aquenios sin incubar (“secos”) o incubados por 24 h a 30°C en soluciones de agua, Fluridone y Etefón (Fig. 3.6 A). Estas determinaciones se hicieron al momento de cosecha y luego de un almacenaje postcosecha prolongado (150 DDC). Contrario a lo esperado, el contenido de ABA en los tres parentales fue opuesto a su nivel de dormición. Los contenidos de ABA no se modificaron durante el almacenaje en seco o postcosecha, aun cuando el nivel de dormición cambió de manera significativa. En los tres genotipos se observó un aumento del contenido de ABA luego de 24 h de incubación, indistintamente del medio de incubación (agua, Fluridone o etefón). Las incubaciones en Fluridone y en etefón presentaron nulas o pequeñas diferencias con respecto a su control en agua. El Fluridone no modificó la germinación, mientras que el Etefón tuvo un efecto promotor en el genotipo 609 (al momento de cosecha) y en el 1579 (al momento de cosecha y en 150 DDC). La falta de respuesta al Fluridone en los tres parentales sugiere que la acumulación de ABA durante la incubación no depende de la síntesis actual de carotenoides, la cual es bloqueada por el Fluridone. En ausencia de carotenoides, la síntesis de ABA podría ocurrir a partir de precursores ya acumulados en el embrión, y hasta que estos se agoten. Alternativamente, el ABA podría provenir de la hidrólisis de conjugados también acumulados en el embrión. La incubación en etefón tampoco modificó los niveles de ABA, descartando cambios en el metabolismo de ABA

mediados por esta hormona. Aun así, las incubaciones en etefón promovieron una mayor germinación (Fig. 3.6 B), pudiendo inferir que la vía regulatoria en la que interviene el etileno podría ser la sensibilidad al ABA. La magnitud de esta respuesta al Etefón dependió del genotipo ya que solo se observó un aumento en la germinación en el 609 y 1579 (aquellos con menor DEBT).

Los contenidos endógenos de ABA en los híbridos F1 fueron intermedios a los de los parentales, tanto al momento de cosecha como a los 150 DDC (Fig. 3.6 C). Nuevamente se observó un aumento en el contenido de ABA luego de 24 h de incubación en agua en todos los casos, y el valor alcanzado en cada caso dependió del genotipo (éste fue mayor en el 609,

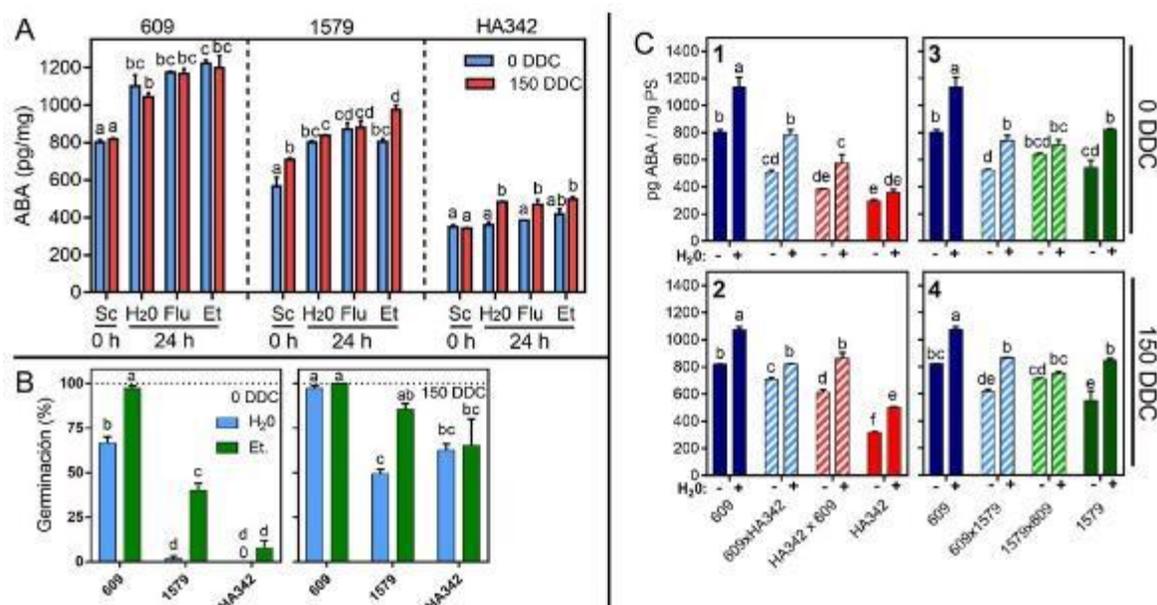


Fig. 3. 6. (A) Contenido endógeno de ABA en ejes embrionarios a cosecha (0 DDC, barras azules) y en la postcosecha (150 DDC, barras azules) en los parentales de los sistemas de cruas (609, 1579 y HA342). Los valores corresponden a los ejes de aquenios “secos” (Sc) e incubados 24 h en agua (H₂O), Fluridone 100 μM (Flu) y etefón 50 μM (Et) a 30°C. **(B)** Germinación final de aquenios de tres parentales, incubados en agua (barras celestes) y etefón 50 μM (barras verdes) a 30°C, en los dos momentos donde se evaluaron los niveles endógenos de ABA (0 y 150 DDC). **(C)** Contenido endógeno de ABA en ejes embrionarios a cosecha (0 DDC: paneles 1, 3) y en la postcosecha (150 DDC: paneles 2, 4) en los parentales de los sistemas de cruas HA342:609 (1, 2) y 1579:609 (3,4). Los valores corresponden a los ejes de aquenios secos (-) e incubados 24 h en agua (+). En **A**, **B** y **C**, los datos corresponden al *experimento 4* y cada barra muestra la media ± su EE (n=3). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

y menor en el parental de mayor dormición, HA342). En el sistema HA342:609, donde se observó un fuerte contraste en el contenido de ABA entre parentales (por ej. 358 y 1136 pg ABA/mg ps para HA342 y 609 respectivamente, en aquenios incubados en agua al momento de cosecha) los híbridos tuvieron valores intermedios, aunque con una ligera (pero significativa) desviación hacia el parental materno (por ej., HA342-609 y 609-HA342 tuvieron 787 y 577 pg ABA/mg ps). Por otro lado, en el sistema 1579:609, donde el contraste entre parentales fue menor al sistema anterior (823 y 1136 pg ABA/mg ps para 1579 y 609 respectivamente), los híbridos 1579x609 y 609x1579 presentaron valores de ABA muy similares entre sí (740 y 710 pg ABA/mg ps) y al 1579.

3.3.6.2. *Respuestas a inhibidores de síntesis, catabolismo y agentes oxidantes en los parentales*

El agregado de inhibidores de síntesis de GA (Trinexapack-etil) y etileno (CoCl_2) no modificó la germinación al momento de cosecha de aquenios tanto a 30°C como a 10°C. Tampoco se observó un patrón claro frente al agregado de un agente oxidante (H_2O_2) o de un inhibidor del catabolismo de ABA (Diniconazole). En el experimento 4 la incubación en

Cuadro 3. 2. Germinación final de aquenios y embriones a trinexapac-etil en 250 μM (Trin) y peróxido de hidrogeno 200 μM (H_2O_2) en parentales (609, 1579 y HA342) incubados a 30 y 10°C al momento de cosecha (0 DDC). Los datos corresponden al experimento 4 y cada punto representa la media \pm su desvío estándar (n=3). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), la prueba de medias corresponde a una temperatura de incubación y estructura del fruto.

T° Inc.	Genotipo	Aquenio			Embrión	
		Agua	Trin	H ₂ O ₂	Agua	Trin
30°	609	66,7 \pm 6,1 ^b	84,0 \pm 4,0 ^a	69,3 \pm 11,5 ^b	93,3 \pm 6,7 ^a	84,6 \pm 1,2 ^a
	1579	1,7 \pm 2,9 ^c	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^c	77,1 \pm 20,6 ^a	60,5 \pm 10,7 ^{ab}
	HA342	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^c	10,3 \pm 11,7 ^c	24,5 \pm 23,4 ^{bc}
10°	609	0,0 \pm 0,0 ^a	22,2 \pm 27,8 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	77,8 \pm 3,8 ^a	51,1 \pm 10,2 ^b
	1579	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^c
	HA342	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	8,9 \pm 15,4 ^c	4,4 \pm 7,7 ^c

Cuadro 3. 3. Germinación final de aquenios en agua (H₂O), cloruro de cobalto (CoCl₂) 1 mM y Diniconazole 250 µM (Dini) en los tres parentales de estudio a 30 y 10°C, a cosecha (0 DDC) y 30 DDC. Los datos corresponden al experimento 5 y cada valor representa la media ± su desvío estándar (n=3). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05), la prueba de medias corresponde a una temperatura de incubación y momento (cosecha y 30 DDC).

T° Inc.	Genotipo	0 DDC		
		Agua	CoCl ₂	Dini
30°	609	33,3 ± 4,6 ^{ab}	46,6 ± 32,6 ^a	13,3 ± 1,3 ^{bc}
	1579	1,3 ± 2,3 ^c	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
	HA342	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
30 DDC				
30°	609	92,0 ± 8 ^a	84,6 ± 1,2 ^{ab}	90,7 ± 6,1 ^a
	1579	57,3 ± 18,9 ^{ad}	82,7 ± 11,5 ^{ab}	33,3 ± 6,11 ^{cd}
	HA342	53,3 ± 8,1 ^{bd}	61,3 ± 6,1 ^{ac}	25,3 ± 20,13 ^d
10°	609	13,3 ± 19,7 ^{bc}	0 ± 0 ^c	1,3 ± 2,3 ^c
	1579	73,3 ± 16,2 ^a	72,0 ± 20,8 ^a	40 ± 8 ^{ab}
	HA342	17,3 ± 8,3 ^{bc}	13,3 ± 2,3 ^{bc}	4 ± 4 ^c

trinexapac- etil y H₂O₂ al momento de la cosecha a 30 y 10°C no modificó la capacidad germinativa de aquenios y embriones en ninguno de los genotipos en los parentales (Cuadro 3.2). Luego, en el experimento 5, incubaciones con CoCl₂ y Diniconazole al momento de cosecha y 30 DDC a 30 y 10°C no modificaron la germinación de aquenios (Cuadro 3.3).

3.3.6.3. *Reversión del efecto del ABA por etefón en embriones y aquenios*

De acuerdo con los resultados previos, los diferentes niveles de dormición observados entre genotipos y su pérdida durante la post-maduración estaría regulada principalmente por cambios en la sensibilidad al ABA endógeno. Esta última es evaluada indirectamente mediante la respuesta de embriones aislados incubados en ABA exógeno (Fig. 3.4). Otra forma de evaluar la sensibilidad al ABA es mediante la aplicación de hormonas que antagonizan la acción del ABA, como GA y etileno. Menores niveles de dormición resultarían de una menor la sensibilidad al ABA y de un aumento en la sensibilidad a GA y

etileno (etefón). Esto se observó tanto en los parentales como en los híbridos recíprocos (Fig. 3.4, 3.5) usando los materiales del *experimento 4*. En el siguiente experimento (5; Fig. S. 3.4) se investigó la reversión del efecto del ABA exógeno por el agregado de etefón en los parentales (609, 1579, HA342; Fig. 3.7). Al momento de cosecha, el genotipo 609 presentó una alta germinación de embriones en ABA 50 μ M a 30°C, sin embargo, en 1579 y HA342 fue cercana a 0% y el agregado de etefón en la solución con ABA no removió dicha inhibición. A los 30 DDC, aunque la germinación de embriones de 1579 y HA342 en ABA 50 μ M fue nula, el agregado de etefón aumentó la germinación en ambos casos (ca. 50 y 90% en HA342 y 1579 respectivamente). En los aquenios incubados ocurrió algo similar, la sensibilidad relativa de los genotipos respetó la misma tendencia (609 menor capacidad de

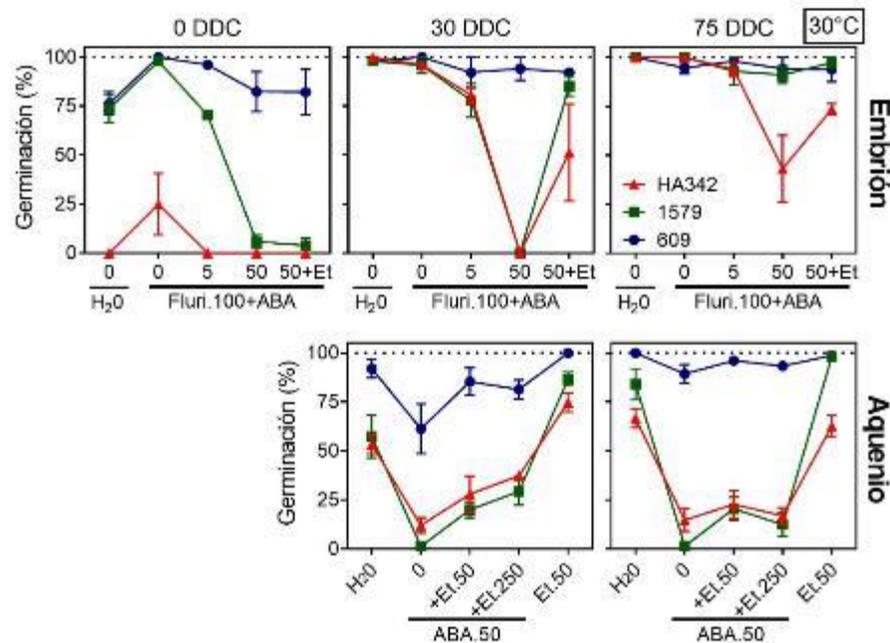


Fig. 3. 7. Respuesta a Fluridone, ABA, etefón y la combinación de Fluridone, ABA y etefón en los tres parentales utilizados: 609, 1579 y HA342. *Fila superior:* Germinación final de embriones en agua destilada (0, H₂O), soluciones con Fluridone (0) 100 μ M en combinaciones con ABA 5 y 50 μ M (5 y 50) junto a etefón 50 μ M (50+Et). *Fila inferior:* Germinación final de aquenios incubados en agua destilada (H₂O), ABA 50 μ M (0), etefón 50 μ M (Et) y ABA 50 μ M junto a etefón 50 μ M (+Et.50) y 250 μ M (+Et.250). Los ensayos de germinación se realizaron a cosecha (0 DDC) y diferentes tiempos durante la postcosecha (30 y 75 DDC) a 30° de incubación. Los datos corresponden al *experimento 5* y cada punto representa la media \pm su EE (n=3).

respuesta a ABA que 1579 y HA342) y el etefón revirtió parcialmente (y en menor magnitud que en los embriones) la inhibición impuesta por ABA en los genotipos con mayor dormición.

3.3.6.4. Asociación de la TI con la sensibilidad al ABA y a la hipoxia.

En esta sección se abordó el posible rol de las cubiertas del fruto en la imposición de la dormición a través de la restricción de los niveles de oxígeno en el embrión, mediante la comparación de la germinación de aquenios en dos niveles de O₂ (21 y 3%). Paralelamente, se evaluó la posibilidad de un efecto sinérgico para el efecto inhibitorio de la hipoxia y del ABA mediante la incubación de embriones aislados en diferentes concentraciones de ABA y dos niveles de O₂ (21 y 3%). Esto se exploró en ensayos de incubación con tres de los parentales (609, 1579 y HA342 en el *experimento 5*), y uno de los sistemas de cruza (HA342:609 en el *experimento 4*).

En la Fig. 3.8 (paneles A y B) se muestran los valores de germinación obtenidos en dos niveles de oxígeno (21 y 3%) para aquenios y embriones incubados a 30°C, en agua o ABA, y dos momentos postcosecha (40 y 100 DDC). Cabe notar que los aquenios de HA342 y 1579 no mostraron TI persistente en atmósfera normal, como resultado de un efecto del ambiente asociado con el atraso significativo de la fecha de siembra de este experimento (Fig. 3.8 B; ver dinámicas de salida [Fig. S. 3.2](#)). Sin embargo, la incubación de aquenios en 3% O₂ inhibió fuertemente la germinación en los tres parentales sugiriendo que la hipoxia refuerza la TI (incluso en 609). Aunque los embriones aislados e incubados en agua germinaron totalmente en 21 y en 3% O₂, la sensibilidad al ABA se exacerbó en hipoxia en los tres genotipos. Sin embargo, este efecto de la hipoxia sobre la sensibilidad al ABA fue algo menor en el genotipo 609 comparando con 1579 y HA342, y esta diferencia se acentuó

a los 100 DDC, luego de que se redujeron los niveles de dormición. Estos resultados muestran que los materiales HA342 y 1579 tienen una mayor sensibilidad relativa a los factores restrictivos testeados (hipoxia y ABA) comparando con el 609, de acuerdo con los fenotipos de dormición descriptos previamente.

Paralelamente, se evaluó la posibilidad de revertir la inhibición impuesta por hipoxia sobre los aquenios mediante el suplemento de etileno (incubando en etefón). De acuerdo con los

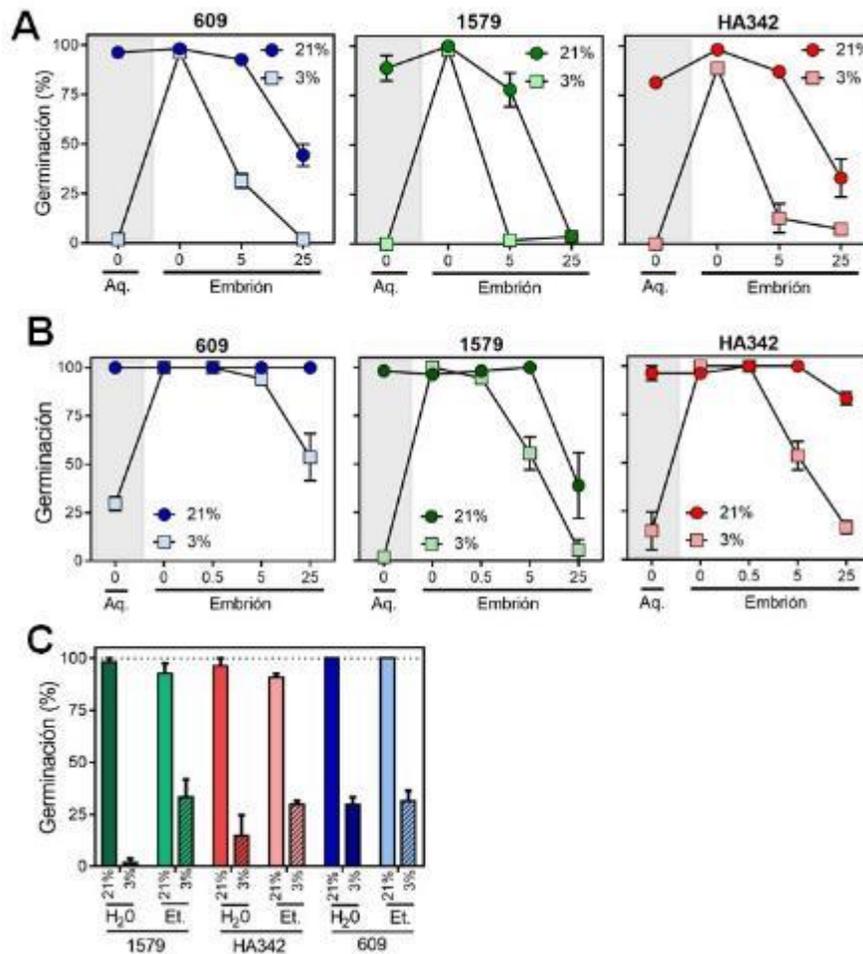


Fig. 3. 8. Germinación de aquenios (0, Aq.) y embriones en agua (0, Embrión) y embriones en ABA 0,5, (solo en el panel B) 5, 25 μ M bajo una atmosfera de hipoxia (3% O₂, cuadrados) y atmosfera normal (21% O₂, círculos) a 30° de incubación en los tres parentales del experimento 5 (609 -azul-, 1579 -verde-, HA342 -rojo-). Los paneles **A** y **B** muestran las respuestas en distintos momentos durante la postcosecha (40 y 100 DDC respectivamente). Cada punto indica la media \pm su EE (n=3). El panel **C** muestra la germinación de aquenios en agua (H₂O) y etefón 50 μ M (Et.) bajo una atmosfera de hipoxia (3% O₂, barras rayadas) y normoxia (21% O₂, barras lisas). Cada barra indica la media \pm su EE(n=3) y letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

datos de la Fig. 3.7, la inhibición de la germinación de embriones incubados en ABA pudo ser revertida casi totalmente por la incubación en etefón, mientras que esta reversión fue parcial en los aquenios. Asumiendo que la hipoxia promueve la inhibición por un aumento de la sensibilidad al ABA endógeno, se evaluó también la posibilidad de una reversión de la inhibición de la germinación en hipoxia por el agregado de etefón (Fig. 3.8 C). Nuevamente (similar a lo que ocurre con los aquenios en ABA y etefón en atmósfera normal, Fig. 3.7), se obtuvo una reversión parcial en 3% de O₂ y etefón (la germinación de los aquenios no superó el 30%). Aunque esto no es concluyente en cuanto al modo de acción de la hipoxia, del etileno y del ABA, sugiere que el efecto del etileno en la promoción de la germinación estaría condicionado por la actividad de señalización del ABA (señal que se ve exacerbada con el aumento de la hipoxia, la cual es promovida por altas temperaturas de incubación).

Usando el sistema de cruzas HA342:609 (material del *experimento 4*), se evaluó la germinación de aquenios en normoxia e hipoxia (3% O₂) y su efecto sobre la expresión de la TI incubando a 30°C (Fig. 3.9). El parental HA342 mostró TI, la cual se acentuó fuertemente en hipoxia. La condición de hipoxia también promovió la TI (aunque en menor medida) en el parental 609. A los 75 DDC, los híbridos respondieron diferencialmente a la hipoxia, y de acuerdo con el respectivo parental materno. El híbrido 609xHA342 fue similar al parental 609, mostrando que el aporte del parental HA342 al genotipo del cigoto tuvo poca importancia en presencia de las cubiertas del parental 609. En el híbrido recíproco (HA342x609) la germinación en normoxia y en hipoxia fue intermedia a la de los parentales, señalando un aporte de las cubiertas de HA342 en la TI y en el refuerzo de ésta por la hipoxia. Este efecto de las cubiertas de HA342 sobre la TI en hipoxia, se disipó luego del almacenaje

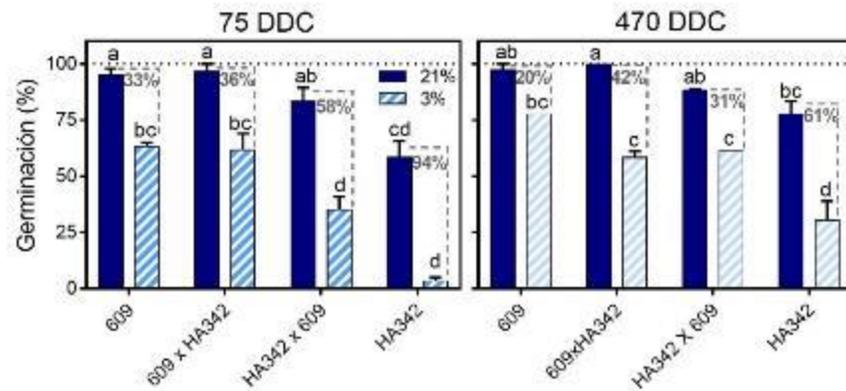


Fig. 3. 9. Germinación achenos bajo una atmosfera de hipoxia (3% O₂, columnas a rayas) y atmosfera normal (21% O₂, columnas rellenas) en dos parentales (609, HA342) y sus respectivas cruas del experimento 4 (609xHA342, HA342x609) a 30° de incubación. Las determinaciones se realizaron a los 75 y 470 DDC. Los valores en porcentajes sobre las columnas indican los niveles de respuesta a la hipoxia con respecto a la atmosfera normal. Cada columna indica la media ± su E.E. (75 DDC, n=3; 470 DDC, n=2) y letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

prolongado (470 DDC), y la germinación en hipoxia estuvo más asociada con el cigoto. Por lo tanto, la respuesta de los achenos a la hipoxia parece resultar de la contribución de las cubiertas y del cigoto, y la contribución relativa de ambos componentes puede variar en el tiempo.

3.3.7. Estructura de los achenos y pericarpios. Mediciones morfológicas y cortes histológicos

En la Imagen 3.4 se visualizan los cortes trasversales en la región ecuatorial de los achenos mostrando la zona del pericarpio. Se pueden observar la disposición de los distintos tejidos del pericarpio, en una posición adaxial la epidermis y luego la hipodermis. Contigua a esta se encuentra la capa de fitomelanina, que separa la hipodermis del parénquima medio. Dentro del parénquima medio, pueden separarse dos grandes tejidos: próximo a la capa de fitomelanina el esclerénquima y luego el parénquima interno (no esclerosado) adyacente a la testa. La histogénesis del parénquima esclerosado comprende el engrosamiento de las paredes y la deposición de lignina y celulosa, confiriendo cierta rigidez e impermeabilidad

al pericarpio (López y Barclay, 2017). Las capas internas del parénquima en los cortes anatómicos muestran una menor resistencia y se encuentran comprimidas por efecto del crecimiento del embrión, y es donde suelen encontrarse los haces vasculares. Además, suele notarse que las transecciones de los pericarpios maduros muestran varias capas de fibras transversalmente poligonales interrumpidas por rayos de parénquima de 1-3 células de ancho. Luego, la testa y el endosperma componen la llamada cubierta seminal, que junto al tejido embrionario conforman la semilla (Roth, 1977; Knowles, 1978; Seiler, 1997; Lindström *et al.*, 2000, 2007).

El espesor del pericarpio y parénquima medio mostró diferencias entre los parentales (Cuadro 3.4). Los parentales 609 y 1579 presentaron un menor espesor de pericarpio y parénquima medio que HA342 y B123 (aunque este último no mostró diferencias

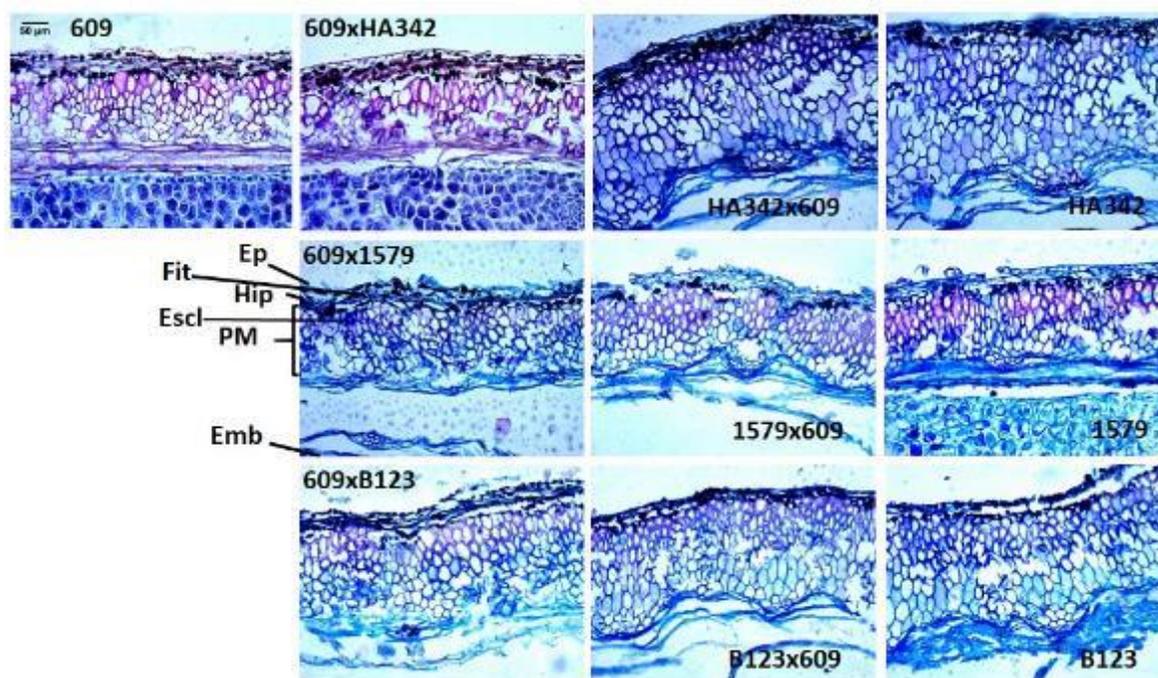


Imagen 3.4. Cortes transversales de pericarpios maduros en la región ecuatorial del achenio para los 4 parentales (HA342, B123, 1579, 609) y sus respectivos híbridos (HA342x609, 609xHA342, 1579x609, 609x1579, B123x609, 609xB123). Los achenios provienen del experimento 4. Abreviaturas: Ep, epidermis; Fit, fitomelanina; Hip, hipodermis; Escl, células esclerosadas (tonalidad rojiza y grosor de la pared secundaria); PM, parénquima medio; Emb, embrión. La barra indica una escala de 50 µm (1pix=0,22µm). La imagen se observa con aumento de 20x.

Cuadro 3. 4. Mediciones sobre lo cortes de pericarpios realizados en parentales (HA342, B123, 1579, 609) e híbridos (HA342x609, 609xHA342, 1579x609, 609x1579, B123x609, 609xB123). Se muestra el espesor total del pericarpio, espesor del parénquima medio en μm y la cantidad de capas de células del parénquima medio. Media \pm erros estándar (n=3), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Genotipo	Espesor Pericarpio (μm)	Espesor Par. Medio (μm)	Nº capas de cel. Par. Medio
609	175,2 \pm 12,3 ^A	135,4 \pm 14,5 ^A	7 \pm 0,5 ^A
609xHA342	179,4 \pm 18,3 ^A	140,3 \pm 19,0 ^A	6 \pm 0,4 ^A
HA342x609	315,9 \pm 19,6 ^B	270,2 \pm 14,8 ^B	9 \pm 0,5 ^A
HA342	287,0 \pm 28,8 ^B	245,8 \pm 26,5 ^B	8 \pm 0,5 ^A
609x1579	185,0 \pm 5,9 ^A	154,6 \pm 6,3 ^A	6 \pm 0,4 ^A
1579x609	166,8 \pm 5,8 ^A	139,9 \pm 3,5 ^A	6 \pm 0,4 ^A
1579	176,8 \pm 5,7 ^A	145,1 \pm 5,7 ^A	6 \pm 0,6 ^A
609xB123	236,7 \pm 10,9 ^A	106,7 \pm 11,2 ^A	8 \pm 0,3 ^A
B123x609	253,8 \pm 33,9 ^A	225,9 \pm 32,6 ^A	8 \pm 1,0 ^A
B123	220,9 \pm 21,0 ^A	189,5 \pm 19,1 ^A	8 \pm 0,2 ^A

estadísticas significativas con los dos primeros). Los híbridos tendieron a asemejarse a su parental materno (p ej. HA342 similar a HA342x609). En el sistema de cruzas HA342:609 (como también en B123:609), el parental HA342 y su craza HA342x609 presentaron un mayor espesor del parénquima medio y total, así como una ligeramente mayor cantidad de células parenquimáticas que 609 y el híbrido 609xHA342. Las mayores diferencias se concibieron en el parénquima medio con paredes celulares visualmente más gruesas y esclerosadas, y sin diferencias visuales en la densidad de la capa de fitomelanina. El espesor del parénquima medio fue de 245,8 \pm 26,5 y 270,2 \pm 14,8 μm en los genotipos HA342 y HA342x609 respectivamente, mientras que en los genotipos 609 y 609xHA342 fue de 135,33 \pm 14,5 y 140,27 \pm 19,0 μm (HA342 tuvo \approx 80% mayor espesor que 609). El número de células fue levemente mayor en el parental HA342 con respecto a 609, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre parentales y sus respectivos híbridos, por lo que podría inferirse indirectamente que tales diferencias del parénquima medio podrían estar

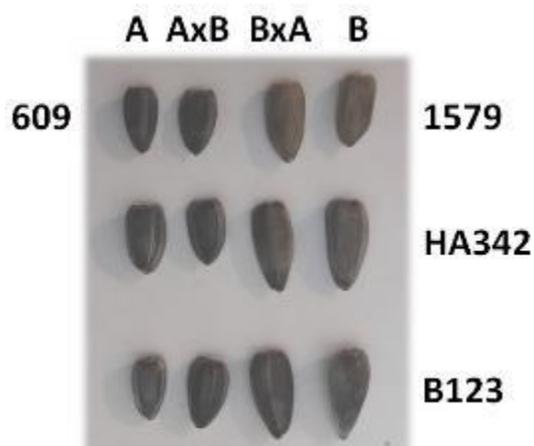


Imagen 3.5. Aqueños de los parentales involucrados en los cruzamientos (609 -izquierda-, 1579, HA342, B123 -derecha-) y los híbridos recíprocos (609x1579, 1579x609; 609xHA342, HA342x609; 609xB123, B123x609).

dadas por un mayor tamaño de las células. En el sistema de cruzas 1579:609, no hubo diferencias entre parentales en cuanto al espesor del pericarpio, parénquima medio y el número de capas de células. El espesor del parénquima medio en los genotipos 1579 y 1579x609 fue de $145,1 \pm 5,7$ y $139,9 \pm 3,5$ μm respectivamente, mientras que en los genotipos 609 y 609x1579 fue de $135,33 \pm 14,5$ y $154,6 \pm 6,3$ μm respectivamente. Asimismo, no se observaron diferencias visuales en el engrosamiento de las paredes celulares y el grado de esclerosamiento del parénquima medio, y densidad de la capa de fitomelanina.

En el análisis de características morfológicas de los aqueños se hicieron mediciones del largo, ancho y espesor (Cuadro 3.5, Imagen 3.5) con el objetivo de comparar estas dimensiones en los híbridos obtenidas con respecto a su parental materno. Principalmente, los parentales se diferenciaron entre sí en el largo y espesor de los aqueños y en menor medida en su ancho. Los híbridos tendieron a parecerse a su parental materno, indicando que las dimensiones del aqueño están determinadas por la madre (condicionando este carácter por la dirección del cruzamiento). Por ejemplo, los aqueños de HA342 y HA342x609 tuvieron un largo y espesor similar entre sí, que fue mayor que el observado en 609 y

Cuadro 3.5. Características morfológicas de los aquenios en los parentales (HA342, B123, 1579, 609) e híbridos F1 (HA342x609, 609xHA342, B123x609, 609xB123, 1579x609, 609x1579). De izquierda a derecha, en las columnas se indica: el peso (expresado en mg, para 1000 unidades) de aquenio, de cáscara, pepita (semilla sin pericarpio), la relación peso de pericarpio/pepita y dimensiones del aquenio (largo, ancho, espesor). Las medias con una letra iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Genotipo	Peso de 1000 unidades				Dimensiones		
	Aq.	Per.	Pep.	Per/ pep.	Largo	Ancho	Espesor
609	36,9 ± 1,4	6,4	24,8	0,26	8,8 ± 0,08 ^{AB}	5,1 ± 0,07 ^{AB}	3,3 ± 0,07 ^{AI}
609x1579	40,5 ± 0,3	9,6	34,4	0,28	8,7 ± 0,14 ^A	5,0 ± 0,12 ^A	3,0 ± 0,15 ^A
1579x609	55,3 ± 2,6	13,2	48,8	0,27	10,5 ± 0,10 ^C	5,9 ± 0,13 ^{CD}	3,4 ± 0,08 ^{AB}
1579	48,2 ± 1,8	12,8	38,4	0,33	10,7 ± 0,09 ^{CD}	5,54 ± 0,05 ^{ABC}	3,2 ± 0,06 ^{AI}
609xHA342	43,2 ± 1,7	10,0	37,2	0,27	8,8 ± 0,11 ^{AB}	5,5 ± 0,11 ^{ABC}	3,4 ± 0,05 ^{AB}
HA342x609	72,4 ± 2,3	17,6	57,6	0,31	12,0 ± 3,56 ^F	5,53 ± 0,29 ^{ABC}	3,56 ± 0,10 ^{BI}
HA342	64,0 ± 1,6	16,4	52,4	0,31	11,9 ± 0,10 ^F	5,6 ± 0,08 ^{ABC}	3,7 ± 0,10 ^{BC}
609xB123	59,2 ± 0,9	nd	nd	nd	9,3 ± 4,00 ^B	6,3 ± 0,13 ^D	4,0 ± 0,11 ^D
B123x609	71,3 ± 1,3	18,4	56,0	0,33	11,0 ± 0,18 ^{DE}	5,8 ± 0,20 ^{BCD}	3,8 ± 0,11 ^{CI}
B123	69,5 ± 2	17,6	57,6	0,31	11,3 ± 0,11 ^E	5,5 ± 0,12 ^{ABC}	3,8 ± 0,11 ^{CI}

*nd, no hay dato.

609XHA342. Esta tendencia se repitió en los sistemas de cruzas 1579:609 y B123:609. Por otro lado, también se realizaron mediciones del peso de mil aquenios, determinando pepita y pericarpio por separado, y su relación (Cuadro 3.5). Se pudo observar una clara similitud entre híbridos y su parental materno, y al mismo tiempo una clara diferencia entre líneas parentales. El parental 609 y sus híbridos (609xHA342, 609x1579) tuvieron un menor tamaño (a través de las dimensiones), peso de mil aquenios y relación pericarpio/pepita, luego el parental 1579 y finalmente HA342 y B123.

3.3.8. Asociación entre variables de dormición, características morfológicas del aquenio y anatomía del pericarpio

En la [Fig. S. 3.5](#), se muestran resultados del análisis de correlaciones múltiples entre las variables de dormición (GF.30, T₅₀.30, T₅₀.10, FTI, ABA.30, ABA.10) y variables que describen características morfológicas del aquenio (ver Cuadro 3.4, 3.5). Como era de

esperarse, se encontraron correlaciones significativas entre muchas de estas variables (p.ej. el peso de mil aquenios se asocia con el largo y espesor del aquenio, y también con el peso de mil de la pepita y pericarpio, el ancho del pericarpio y parénquima medio, número de células del parénquima medio).

Así, se seleccionaron algunas variables representativas de la matriz de correlación para realizar un ACP (Fig. 3.10). En el CP1, que explica el 60,2% de la variabilidad total, genero un gradiente de genotipos según su nivel de dormición al momento de cosecha (GF.30), persistencia en la postcosecha (T_{50.30}, T_{50.10}), presencia de TI persistente (FTI), sensibilidad (respuesta germinativa a los 75 DDC en %) al ABA (ABA.30, ABA.10), tamaño de grano (largo), peso del aquenio (P.Aq.), relación pericarpio/pepita y espesor del pericarpio (Esp.Per). Así, sobre la izquierda del CP1 se ubicó el parental 609 con un menor nivel de dormición, asociándose positivamente con GF.30 y negativamente con las variables de persistencia de la dormición (T_{50.30}, T_{50.10}), sensibilidad al ABA (ABA.30, ABA.10) y presencia de TI (FTI). De manera opuesta, sobre la derecha del CP1 se ubicaron los parentales B123 y HA342, asociándose de manera contrapuesta a las variables a las que se asoció 609. En el caso de 1579, se ubicó desde el centro de coordenadas tendiendo hacia la derecha del CP1, indicando un mayor nivel de dormición y TI de este con respecto a 609, pero menor a HA342 y B123. Con respecto a las variables morfológicas, aquellos genotipos con mayor peso de aquenio, largo, relación pericarpio/pepita y espesor del pericarpio se ubicaron sobre la derecha del CP1 asociándose principalmente con HA342 y B123, en menor medida 1579 y opuesta a 609. Lo interesante es que los híbridos tendieron a ubicarse en la parte central entre ambos parentales de cada sistema de cruza, con la particularidad de que la ubicación de las F1 no fue la misma entre sí, sino que tendieron a aproximarse más a su

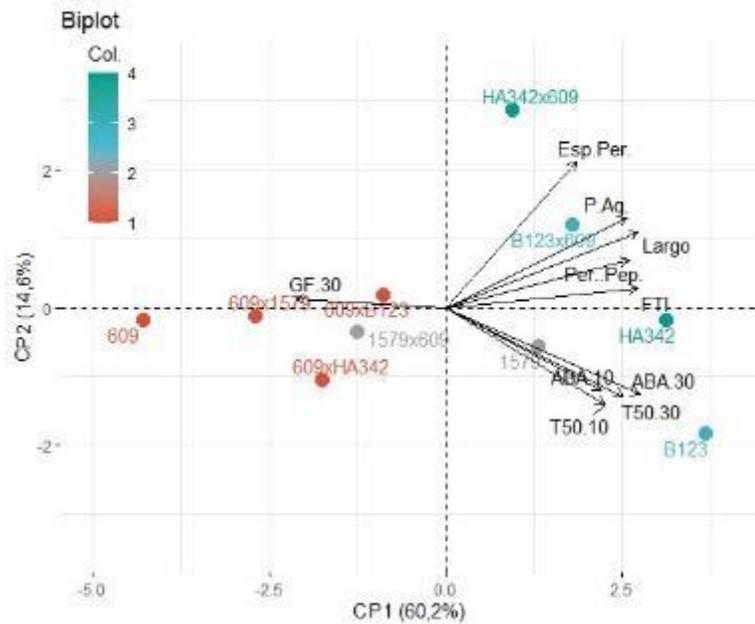


Fig. 3. 10. Biplot correspondiente a los dos primeros componentes principales (CP) de los parentales evaluados (609, 1579, HA342, B123) e híbridos recíprocos (609x1579, 609xHA342, 609xB123, 1579x609, HA342x609, B123x609) del *experimento 4*. Las variables incluidas fueron espesor del pericarpio (Esp.Per.), peso de mil de achenios (P.Aq.), largo del achenio (Largo), relación pericarpio- pepita (Per.:Pep), factor de termo-inhibición (FTI), respuesta de embriones al ABA a 30° y 10° (ABA.30, ABA.10), tiempo en alcanzar el 50% de germinación durante la postcosecha a 30° y 10° (T₅₀.30, T₅₀.10). Los genotipos se representan en puntos de colores según el parental y en las cruza representan al parental que se comportó como madre (609, rojo; 1579, gris; HA342, verde; B123, celeste). Las variables se representan mediante vectores negros.

parental materno. Esto estaría asociado a que los híbridos tendieron a ser morfológicamente semejantes a su parental materno. Además, resalta la presencia de una herencia de tipo incompleta para algunos atributos de dormición (principalmente persistencia en la postcosecha) y otros de tipo materna, como la TI que puede estar sujeta a efectos cigóticos (por ej. sensibilidad al ABA) como maternos (dependientes de los atributos morfológicos del fruto como el espesor del pericarpio o la relación pericarpio/pepita).

3.3.9. Evaluación de la dormición durante el desarrollo de los achenios: respuesta germinativa en agua, hormonas, hipoxia y niveles endógenos de ABA

Las determinaciones de los niveles de ABA en ejes durante el desarrollo de los achenios en los parentales utilizados en los sistemas de cruza no arrojaron asociaciones claras con los

niveles de dormición. Para los tres parentales investigados en mayor detalle (1579, HA342 y 609) se evaluó el contenido endógeno de ABA en el eje embrionario en tres momentos del desarrollo de los aquenios. En concordancia con lo observado por Le Page-Degivry *et al.* (1990), los niveles de ABA decrecieron durante el desarrollo; éstos fueron máximos en la etapa más temprana (12-14 DDF), y cayeron progresivamente hacia madurez de cosecha (Fig. 3.11 A, B). Al comparar los parentales HA342 y 609, se observaron mayores niveles de ABA en el genotipo de baja dormición (609) y esta diferencia fue significativa y aproximadamente constante en los tres momentos del desarrollo evaluados. En momentos tempranos del desarrollo (14 DDF y 75% de CH del fruto), a pesar de los altos niveles de ABA, se observó una alta germinación de los embriones aislados en agua siendo levemente mayor en HA342 que 609 (Fig. 3.11 C). Particularmente, el genotipo 609 (de baja dormición al momento de cosecha) presentó una mayor capacidad de respuesta de embriones al ABA exógeno. Avanzado el desarrollo de los aquenios (26 DDF y 56% de CH), aunque los niveles de ABA disminuyeron (≈ 50 y 40% en 609 y HA342 respectivamente) ambos parentales presentaron una alta dormición, reflejado en la baja germinación de embriones aislados en agua y ABA. En dicho sistema de cruzas (HA342:609; [Fig. S. 3.6](#)) a pesar de no observarse respuesta a Flurocloridona y una muy baja a GA, se observó una respuesta diferencial a etefón entre parentales e híbridos. Tanto el parental 609 como ambos híbridos (609xHA342 y HA342x609) germinaron el 100% en etefón, mientras que la germinación de HA342 fue menor al 50%. Esto indicaría desde momentos tempranos del desarrollo algún indicio en el tipo de herencia dependiente del cigoto. Una vez alcanzada la madurez de cosecha (luego del secado del aquenio a CH de 6-7%), donde los niveles de ABA resultan ser los más bajos desde momentos tempranos del desarrollo, el parental 609 tuvo un contenido de ABA que

duplicó al de HA342. Sin embargo, el parental 609 presentó una mayor germinación de embriones en agua y una baja capacidad de respuesta a ABA que HA342.

Por otro lado, en el sistema de cruzas 1579:609 (Fig. 3.11 B, D), el parental 1579 (con dormición intermedia-alta) presento mayores niveles de ABA que 609 durante el desarrollo temprano (12 DDF y 75% de humedad de fruto). Sin embargo, como se observó en el otro sistema de parentales, 1579 presento una germinación mayor en agua y ABA que 609. Más avanzado el desarrollo (26 DDF y 55% de humedad) los niveles de ABA disminuyeron y se igualaron entre parentales. La germinación de embriones fue levemente mayor en 609 pero ambos parentales tuvieron una baja germinación en ABA. En este sistema de cruzas (Fig. S. 3.6) la germinación de embriones aislados en agua de ambas cruza fue similar a la de 609.

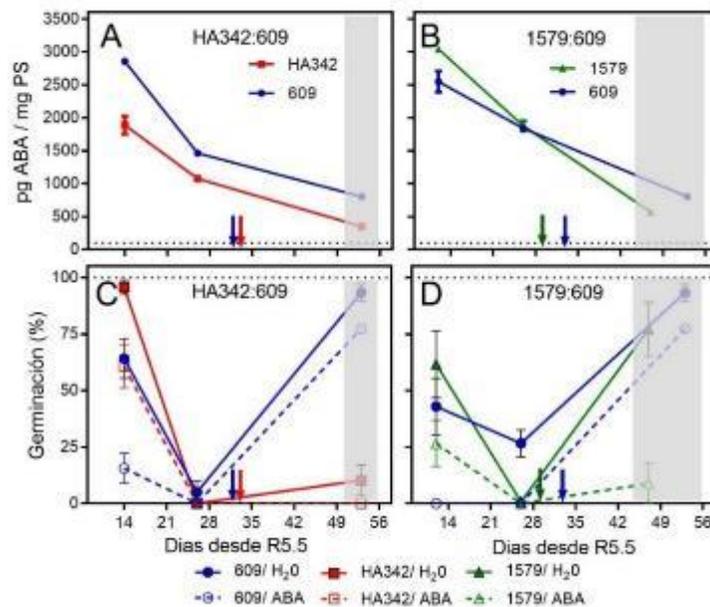


Fig. 3. 11. Evolución durante el desarrollo de los achenios (en DDF o R5.5) del contenido endógeno de ABA en ejes embrionarios (panel A y B) y de la germinación a 30°C de embriones aislados (paneles C y D) en agua (símbolos y líneas llenas) y en ABA 5 μM (símbolos vacíos y líneas punteadas; incluyendo Flurocloridona 10 μM para reprimir la síntesis de novo en la incubación) en los parentales (609 -azul-, HA342 -rojo-, 1579 -verde-) de dos sistemas de cruza (HA342:609 y 1579:609). Los momentos de muestreo representan distintos momentos del desarrollo de los frutos: temprano (12-14 DDA y CH ≈76%), más cercano a madurez fisiológica (26 DDA y CH ≈54%) y madurez de cosecha (HA342, 1579, 609) luego del secado del fruto a CH de 6-7% (representado por el sombreado gris). Las flechas sobre el eje de las abscisas indican el momento en que se alcanzó la madurez fisiológica en cada parental. Los datos corresponden al *experimento 4* y cada punto representa la media ± su EE (n=3).

Sin embargo, en ambos parentales e híbridos los embriones aislados presentaron cierta capacidad de respuesta a Flurocloridona (mayor en 609 y su cruce) y una alta respuesta a GA (desde 1 a 100 μ M) o etefón. Alcanzada la madurez de cosecha, nuevamente el parental de mayor dormición 1579 presentó menores niveles de ABA endógeno que 609, a pesar de contar con una mayor capacidad de respuesta al ABA exógeno.

En el *experimento 5* se evaluó la germinación a los 27 DDF y se observaron nuevamente diferencias entre parentales en la capacidad germinativa ([Fig. S. 3.7](#)). El parental 609 mostró una fuerte imposición de la dormición por las cubiertas (de la cubierta seminal principalmente) al observarse una alta germinación de embriones incubados en agua (>75%) con respecto a HA342 y 1579 (\approx 0%). Además, los tres parentales mostraron respuesta a Fluridone, donde en 609 completó la germinación de los embriones (de 75 a 100%) al igual que en 1579 y HA342 (de 0 a 100%). En cuanto a la respuesta a GA y Etefón siguió el mismo patrón observado en el *experimento 4*, donde 609 y 1579 tuvieron una alta respuesta en comparación a HA342. La respuesta a H₂O₂ (agente oxidante) fue nula sobre todos los genotipos como se había observado en el *experimento 4* (Cuadro 3.2).

3.4. Discusión

En este capítulo se estudiaron las posibles vías de herencia de la dormición en aquenios híbridos de girasol, usando líneas comerciales como parentales y realizando cruzamientos recíprocos. Los parentales seleccionados para las cruces se caracterizan por tener niveles medios-altos de dormición (DEBT) y TI (1579, HA342, B123), y cada uno de estos se combinó con un mismo parental con baja dormición (DEBT) y sin TI (609). La TI es de particular interés por tratarse de un problema en la producción de semilla híbrida de girasol,

ya que mientras que la dormición suele atenuarse con el tiempo de almacenaje, la TI puede ser persistente y limitar indefinidamente la comercialización de lotes que presentan este rasgo (intensificado por un efecto materno-ambiental, o por algún aspecto del manejo en postcosecha, y/o tratamientos de “curado” según comunicaciones o consultas personales desde la industria). Para los tres sistemas de cruzas se llevó a cabo el fenotipado de dormición de los frutos a partir de variables establecidas en el Capítulo 2 (Arata *et al.*, 2021). Además de estas variables (germinación de frutos, semillas y embriones a 10 y 30°C, y distintos tiempos de almacenaje) se incluyeron otras determinaciones fisiológicas (respuesta a inhibidores y hormonas exógenas -embrión al ABA, respuesta de aquenios a GA y Etefón-, sensibilidad a la hipoxia, contenidos de ABA, entre otros) potencialmente involucradas en el control de la dormición.

Los resultados del presente capítulo demostraron la relevancia del genotipo del embrión-cigoto sobre la dormición (DEBT) a través de una dominancia incompleta (ambos híbridos fueron similares siendo indistinta la dirección del cruzamiento) en los 3 sistemas de cruzas evaluados (Fig. 3.3). Dentro de cada sistema de cruzas, los híbridos recíprocos presentaron una velocidad de SD intermedia a los parentales, reflejando la importancia del cigoto en la respuesta del fruto en las etapas tempranas de postcosecha mientras se pierde gradualmente la dormición embrionaria (DEBT). Para las cruzas en que se transmitió la TI a la F1, esta fue heredada por vía materna y se manifestó una vez avanzado el almacenaje postcosecha. Los parentales HA342 o B123 (definidos en el Capítulo 2 por tener una alta DEBT y TI), transmitieron la TI por vía materna a la F1 híbrida (30°C; Fig. 3.3 B y C). Esto se asemeja a lo observado en los estudios de hibridación entre girasoles silvestres con genotipos cultivados, donde la progenie heredó la fuerte dormición impuesta por cubiertas (ver Capítulo

2) del parental materno silvestre (Brunick, 2007; Hernández *et al.*, 2017; Pace *et al.*, 2015; Weiss *et al.*, 2013). Sin embargo, esta transmisión de la TI por cubiertas a la F1 híbrida estuvo condicionada por el genotipo usado como parental de alta dormición. En el sistema 1579:609 esta imposición por las cubiertas no se expresó en el híbrido 1579x609 que tuvo una dinámica (T_{50}) similar al híbrido recíproco (609x1579) en toda la post-maduración. En este caso, las cubiertas del parental 1579 por sí solas no llegaron a imponer la TI al embrión híbrido, que exhibe una menor dormición (y menor sensibilidad al ABA) que el parental 1579.

El efecto del pericarpio en la imposición de TI podría estar asociado con cambios en el metabolismo del ABA en la semilla, tanto en el endosperma como en el eje embrionario. En *Arabidopsis*, el fenotipo de dormición de la descendencia híbrida está determinado por el genotipo materno debido a que la dormición está impuesta directamente por las cubiertas (a partir del “imprinting” genómico). En las semillas de *Arabidopsis* el endosperma sintetiza, secreta y transporta específicamente el ABA hacia el embrión, reprimiendo su germinación (Bethke *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015). A su vez, la síntesis de ABA es promovida por las altas temperaturas de incubación (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Evidencias previas en girasol mostraban que el contenido de ABA en el embrión tiende a aumentar durante la incubación (Domínguez *et al.*, 2016, 2019), aunque no se asoció con la respuesta de germinación comparando tratamientos contrastantes de temperatura de incubación (12 vs. 30°C) y de oxígeno (5 vs. 21%). En esta tesis tampoco se asoció el aumento en el contenido de ABA durante la incubación comparando genotipos con niveles contrastantes de DEBT y TI, ni se vieron cambios asociados con el tiempo de postcosecha. De manera similar, en un trabajo reciente con semillas (sin pericarpio) de girasol, Xia *et al.* (2019) también observaron que el metabolismo de ABA no se asoció con los niveles de dormición. Sin embargo, de

manera similar a *Arabidopsis*, observamos que el endosperma de girasol produce y secreta ABA al medio durante la incubación, aunque parece tener un rol menor en esta especie en cuanto al control de la germinación. Determinaciones del contenido endógeno de ABA en frutos de girasol del genotipo 1552 (Capítulo 2) han mostrado que el endosperma produce muy bajas cantidades de ABA comparativamente al ABA contenido en el embrión (1-2% del ABA embrionario). Por otro lado, el ABA del embrión embebido no escapa al medio de incubación ([Fig. S. 3.8](#)), contrario a lo observado en sorgo (Gualano *et al.*, 2007) y quinua (Ceccato *et al.*, 2015). En girasol, la evidencia sugiere que gran parte de la regulación fisiológica de la germinación ocurre a nivel de la sensibilidad del embrión al ABA endógeno, y que las cubiertas operan sobre esta vía, posiblemente a través de la difusión del O₂. Un rol similar para las cubiertas en la restricción al ingreso de O₂ se ha propuesto en *Arabidopsis* (Fedi *et al.*, 2017). Estos autores encontraron que mutantes deficientes de suberina en la testa presentaron una menor dormición, mayor permeabilidad a tetrazolio y posiblemente, mayor difusión del O₂ hacia el embrión. En girasol, este efecto de la hipoxia sobre la germinación estaría mediado por cambios en la señalización del ABA, a diferencia de otras especies como cebada y *Arabidopsis* donde se observó que la hipoxia produce cambios en el metabolismo de ABA y en su señalización (Benech-Arnold *et al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2006; Fedi *et al.*, 2017). En girasol, la estructura responsable en la imposición de la TI es el pericarpio, con un posible aporte adicional de la cubierta seminal. Variaciones estructurales en las capas de tejido que componen el pericarpio podrían afectar la permeabilidad al O₂. El pericarpio incluye capas de células esclerosadas, resultado de la deposición de lignina y celulosa en la pared secundaria, que confieren rigidez y reduce la permeabilidad (López y Barclay, 2017). La presencia de capas de células con cierto grado esclerosamiento sobre el parénquima

medio, la densidad de la capa fitomelanina, presencia de ceras en la cutícula y el espesor del pericarpio (Jocković *et al.*, 2020) podrían afectar la permeabilidad al O₂ y contribuir a limitar la disponibilidad de este gas en el eje embrionario. Este efecto limitante se acentúa principalmente a altas temperaturas de incubación donde se estimula el consumo de O₂ por parte del embrión, al mismo tiempo que baja la solubilidad de este gas en agua (Rolletschek *et al.*, 2007; 2009).

La relación entre las características morfológicas e histológicas y la dormición en girasol todavía no está totalmente explicada. Los embriones híbridos recíprocos poseen la misma dotación genética en cuanto al aporte de ambos parentales, aunque la morfología del embrión está determinada por la madre a través del tamaño del ovario (futuro pericarpio) que limita el crecimiento del embrión (Lindstrom *et al.*, 2015; Castillo *et al.*, 2017). En consecuencia, las variables morfológicas del aquenio (como su peso, relación pericarpio/pepita y dimensiones) son determinadas por el genotipo materno, como se ha observado en otras especies como *Phaseolus vulgaris* L. (Singh *et al.*, 2017) y *Arabidopsis thaliana* (Fedi *et al.*, 2017) (ver Fig. 3.5). En los frutos híbridos evaluados en este trabajo, las características del pericarpio (que dependen del parental materno; ver Imagen 3.4, Cuadro 3.4, 3.5) no se asociaron con el comportamiento de dormición de los aquenios en la ventana temporal donde la herencia estuvo determinada principalmente por el genotipo del cigoto. En el caso de los híbridos de los parentales HA342 y B123, que transmitieron el carácter TI a la F1 híbrida (percibida como herencia materna), tendieron a presentar un pericarpio con una mayor proporción del peso del fruto, de mayor espesor y grado de esclerosamiento del parénquima medio con respecto al parental 609. Esto coincide con lo determinado Hernández *et al.* (2017) donde las F1 provenientes de los genotipos silvestres, mostraron pericarpios similares al

genotipo materno con una hipodermis y capa de fitomelanina más gruesa y un esclerénquima con paredes celulares más gruesas y lignificadas. Sin embargo, los cortes histológicos no mostraron diferencias entre los pericarpios de 1579 y 609, al menos en la estructura interna del pericarpio. Esta incapacidad de transmitir la TI por parte del 1579 a la F1 híbrida 1579x609 muestra la relevancia del efecto combinado del cigoto y de las cubiertas en la expresión de la TI.

La importancia del cigoto en la expresión de los fenotipos de dormición por sobre las cubiertas se refleja también en los patrones observados en las respuestas fisiológicas de las F1 con respecto a ambos parentales. En primera medida, se observaron diferencias en sensibilidad al ABA entre parentales (mayor en genotipos de alta dormición), y un comportamiento intermedio en ambos híbridos (Fig. 3.4, ver 75 DDC). Lo mismo sucedió para la sensibilidad al aporte externo de GA y etefón (etileno), donde los parentales presentaron respuestas distintas entre sí (609 mayor sensibilidad) y ambos híbridos en forma intermedia (Fig. 3.5). Esto confirma la importancia del componente cigótico o embrionario en la herencia de este carácter (DEBT). Sin embargo, la transmisión de la TI a la progenie fue por vía materna ya que su expresión depende del pericarpio. Como se observó, la TI se transmitió solamente a la progenie F1 a partir de cruzas con dos (HA342 y B123) de los tres parentales de alta dormición evaluados y esta TI no pudo ser revertida por la aplicación de GA o etefón en los aquenios. La falta de respuesta a los inhibidores de síntesis tanto de GA como de etileno en la germinación en girasol sugiere que el metabolismo de estas hormonas no tiene un rol en la respuesta germinativa (Cuadro 3.2, 3.3). Es así como se resalta el rol central del ABA en la regulación de la dormición. La capacidad de respuesta de los embriones al ABA exógeno ha explicado las diferencias encontradas en dormición de los aquenios entre

parentales e híbridos, en su atenuación durante la postcosecha y las diferencias de expresión en el rango térmico, de mayor sensibilidad a bajas temperaturas (mayores DEBT) y en genotipos con predisposición a expresar TI. Además, esto se corresponde con el rol inverso que tuvieron las GA y el etileno (etefón) en la promoción de la germinación (Fig. 3.4, 3.5). Esto se apoya en lo observado en *Arabidopsis*, donde mutantes con menor dormición inicial tendían a ser resistentes a la TI, debido a una menor sensibilidad al ABA (por ej. *abi-3*) y menores requerimientos de GA (entre otros agentes) para revertir la dormición (Tamura *et al.*, 2006).

Llamativamente, en girasol, observamos que los niveles endógenos de ABA en ejes embrionarios se asociaron negativamente con los niveles de dormición de los parentales al momento de cosecha (Fig. 3.6). Además, los híbridos tendieron a tener niveles de ABA intermedios, sin observarse cambios durante la post-maduración de los aquenios. El aumento de los niveles endógenos de ABA en ejes de embriones incubados en agua no presentó diferencias con respecto al Fluridone. El etileno tampoco pareció afectar el metabolismo de ABA, donde las respuestas a etefón (en germinación) podrían deberse a cambios en la sensibilidad al ABA (no se observaron cambios de los niveles endógenos), dado que el agregado de etefón revirtió la inhibición del ABA con el progreso de la post-maduración de los aquenios (Fig. 3.7). Durante el desarrollo, los niveles endógenos de ABA tampoco se correspondieron con los niveles de dormición de los embriones aislados entre parentales (donde predomina una conjunción de dormición embrionaria y por cubiertas). En términos generales en los tres parentales los máximos niveles de ABA se determinaron tempranamente durante el desarrollo (12 DDA), decayendo progresivamente hasta la madurez (Fig. 3.11), de la mano con lo visto por Le Page-Degivry *et al.* (1990). La capacidad germinativa de

embriones (y de su sensibilidad al ABA) sin embargo fue considerable en momentos tempranos, decayendo avanzado el desarrollo (26-27DDA), donde comienzan a observarse ciertas diferencias entre genotipos que se corresponden con lo observado en cosecha y postcosecha. El parental HA342 resultó menos sensible a etefón y GA que el resto de los parentales y cruzas ([Fig. S. 3.6](#)) y junto a 1579 resultaron ser los más sensible al ABA (luego de la promoción generalizada de la germinación en Fluridone; [Fig. S. 3.7](#)). Luego hacia el momento de cosecha, la capacidad germinativa aumentó, aunque diferencialmente entre parentales y cruzas (Fig. 3.4, 3.11). El rol de la síntesis *de novo* de ABA parece estar relacionado con la inducción y mantenimiento de la dormición durante el desarrollo, decayendo una vez avanzado el desarrollo y la cosecha (Le Page-Degivry *et al.*, 1990, 1996; Le Page-Degivry y Garello, 1992). Esto también se sustenta en la baja asociación entre los contenidos de ABA durante el desarrollo y la dormición entre parentales, siendo incluso la asociación negativa al momento de cosecha. Como se demostró en trigo (Walker-Simmons, 1987, 1988) y sorgo (Gualano *et al.*, 2007), la sensibilidad del embrión al ABA se correlaciona con la variación de la dormición entre genotipos, no así el contenido endógeno de ABA en los embriones.

Para el caso del girasol cultivado, el control de la germinación del fruto no se asocia claramente con el metabolismo del ABA en el embrión (como en lechuga; Argyris *et al.*, 2008) o en la capa de endosperma (como en Arabidopsis; Finkelstein *et al.*, 2008). Con respecto a una restricción mecánica de las cubiertas (como en Arabidopsis y lechuga; Sung *et al.*, 2008; Nambara *et al.*, 2010) esta posibilidad no ha sido probada ni descartada. Aun desconocemos las causas por las cuales es mayor el efecto restrictivo de las cubiertas en algunos genotipos de girasol. Los cortes histológicos de pericarpio presentados en esta tesis

corresponden a la región ecuatorial o parte media del fruto; sin embargo, podrían ser relevantes las características morfológicas en la región micropilar del pericarpio, por donde emerge la radícula a través de la apertura producida a lo largo de la sutura (Vigliocco *et al.*, 2017). El rol de las cubiertas en girasol parece asociarse con una regulación fisiológica en el embrión a través del control del ingreso de O₂ en el fruto embebido (donde se hipotetiza que las diferentes estructuras -endosperma, testa, y pericarpio- constituyen una serie de resistencias para el intercambio gaseoso; Baskin y Baskin 2014). A partir de la imbibición de la semilla los niveles de O₂ debajo de las cubiertas disminuyen rápidamente como consecuencia de la reactivación del metabolismo y la baja permeabilidad de las cubiertas al O₂ (Rolletschek *et al.*, 2007, 2009). Así, la disponibilidad de O₂ en el embrión puede afectar de manera directa al metabolismo y/o sensibilidad hormonal. La presencia de TI en el parental 1579 confirma que detrás del efecto que puedan tener las cubiertas, la interacción con el embrión predispone a su expresión (la cruce 1579x609 no presentó TI). Dicha propensión estaría dada por la alta sensibilidad del embrión al ABA y menor sensibilidad a agentes promotores de la germinación como GA y etefón (Fig. 3.4, 3.5). Asimismo, la hipoxia disminuyó la respuesta a agentes promotores como etileno/etefón (Fig. 3.8 C). Es así como ciertos rasgos como la susceptibilidad de los embriones a sufrir TI a partir de una mayor sensibilidad al ABA en hipoxia, puede transmitirse en parcialmente a la descendencia (Fig. 3.9).

3.5. Conclusiones

La herencia de la dormición en frutos de girasoles cultivados es de origen mixto, ya que está determinada por el genotipo del cigoto y por las cubiertas de origen materno, mostrando que la dormición DEBT y la TI dependen de una interacción entre el embrión

y las cubiertas. La expresión de un determinado fenotipo de dormición en un cruzamiento dependerá de la interacción entre el genotipo del cigoto (principalmente) con el genotipo de las cubiertas determinadas por el parental que se comporte como madre. Así, la presencia de TI persistente dependerá del genotipo logrado del cigoto y su interacción con las cubiertas. Ciertas características fisiológicas del embrión como la alta sensibilidad al ABA y baja a GA y etefón, se asocian con genotipos con una alta dormición y predisponen a la expresión de TI. Además, la presencia de una alta contribución del peso del pericarpio al peso del aquenio, cubiertas de gran espesor y grado de esclerificación de las paredes celulares (que aportan rigidez y podrían disminuir la permeabilidad al intercambio de gases en el fruto embebido) podrían asociarse con este fenotipo. Esta característica podría ser reforzada por tratamientos de curado de semilla habituales en la industria, donde la aplicación de una capa de un polímero o “coating” podría sumar una resistencia más al intercambio gaseoso.

Capítulo 4:

Efecto del ambiente de almacenaje sobre la post-maduración en seco de los aquenios

Resumen

La dormición primaria en aquenios de girasol disminuye durante el almacenaje en seco (o post-maduración). En muchas semillas ortodoxas, este proceso es promovido por mayores TA. Sin embargo, la información publicada en girasol resulta ambigua y/o contradice este patrón. Esto podría deberse a interacciones entre el CH de los aquenios y la TA. En este capítulo se investigó el efecto combinado del CH y la TA sobre la dinámica de SD. Se llevaron a cabo experimentos con dos líneas de girasol (600 y 1579). Al momento de cosecha, los aquenios se almacenaron en una combinatoria de cuatro niveles de CH (4, 6, 8, 10%) y seis TA (-18, +5, 10, 15, 20 y 25°C, eventualmente 30°C). Se evaluó la germinación de aquenios y embriones en agua a 10 y 25 o 30°C, y de embriones en ABA en distintos momentos del almacenaje. Ambos genotipos siguieron patrones similares. La SD fue mayoritariamente promovida en aquenios con CH 6% y dentro de un amplio rango de TA, con un óptimo entre 10-20°C. En frutos con CH 4%, solamente altas TA (20-25°C) promovieron la SD, y ésta se inhibió a TA de 15°C o menores. En aquenios con CH 8 y 10% se observó un patrón de respuesta negativo a la temperatura (a mayor TA se inhibió la SD). Tanto a CH 8 como 10% se observó SD luego de almacenar a TA -18°C, temperatura que inhibió totalmente este proceso en frutos con CH 4 y 6%. Todos estos efectos del ambiente de almacenaje estuvieron acompañados por cambios en la sensibilidad del embrión al ABA. Dentro de los plazos evaluados, los resultados apoyan la SD y el deterioro se tratarían de procesos independientes. Finalmente, se consideró de utilidad la HRe y del ψ_w para modelar la tasa de SD de aquenios. Esto ofrece un marco más adecuado para investigar los

fundamentos bioquímicos detrás de la SD en seco. A partir de estos análisis, identificamos un rango de condiciones “óptimas” para promover la SD y que coinciden con la ausencia de actividad metabólica. A la vez, se plantea un marco de referencia para profundizar en los mecanismos que guían los principales procesos -SD y deterioro- en las semillas ortodoxas usando al girasol como modelo de estudio.

4.1. Introducción

El girasol produce “semillas” de tipo ortodoxas, ya que alcanzan bajos CH al momento de cosecha (Baskin y Baskin, 2004). En este estado de baja hidratación, la movilidad molecular se ve altamente reducida y las semillas se consideran quiescentes o criptobióticas, ya que no llevan a cabo los procesos que solemos asociar a los sistemas vivos (Walters *et al.*, 2005). Las semillas ortodoxas pueden permanecer viables por largos periodos (años) y reanudar las funciones metabólicas normales tras la imbibición. Sin embargo, bajo dichas condiciones de baja hidratación, la dormición primaria se pierde o atenúa progresivamente como parte del proceso conocido como “post-maduración en seco” (o *after-ripening*). Este proceso es afectado por la TA en muchas especies (Probert, 2000), incluyendo girasol (Rodríguez *et al.*, 2018). El patrón general muestra que mayores TA aceleran la SD en muchas especies (Baskin y Baskin, 1976, 1986; *-Bromus tectorum-*, Allen *et al.*, 1995, Bauer *et al.*, 1998; *-Lolium rigidum-* Steadman *et al.*, 2003^{a,b}; *-Lithospermum arvense-* Chantre *et al.*, 2009). Sin embargo, esta respuesta a la TA no siempre es clara incluso dentro de una misma especie, pudiendo reflejar la existencia de interacciones con el CH (Baskin y Baskin, 1979; girasol- Bazin *et al.*, 2011a; *-Arabidopsis thaliana-* Basbous-Serhal *et al.*, 2016; *-Heteropogon contortus-* Baldos *et al.*, 2014; *-Avena fatua-* Foley, 1994; *-Oryza sativa-* Leopold *et al.*, 1988).

El CH de una semilla o fruto está determinado por su composición química (p. ej. contenido de aceite) y por el equilibrio termodinámico que se establece con la HR del aire que la rodea (Ellis *et al.*, 1995). Por lo tanto, variaciones en el CH bajo diferentes ambientes de almacenaje podrían afectar la SD. Algunos trabajos exploraron el efecto del CH de las semillas en el proceso de SD. Debido a que este valor de CH depende de la composición de

aceite de cada especie, se ha utilizado la HR del aire en equilibrio con las semillas para reflejar el estado termodinámico del agua (Vertucci y Roos, 1990). En diversas especies, se ha demostrado que la pérdida de dormición se ve favorecida a HR intermedias, y se ve impedida a HR muy bajas o altas (Finch-Savage y Leubner-Metzger; 2006). Para el caso del girasol, los estudios realizados resultan incompletos en el abordaje de los efectos e interacciones de la TA y del CH dentro del rango en que suelen almacenarse los aquenios (Bazin *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2018). Por ejemplo, Bazin *et al.* (2011^a) exploraron los efectos del almacenaje de frutos con valores de CH de 3, 4, 5, 10 y 12% en combinación con diferentes TA (15-30°C). Estos autores reportaron que a bajos CH (menores al 5%, base PS) la SD embrionaria fue promovida por bajas TA (15°C), mientras que a CH mayores al 10% esta respuesta se invirtió, y altas TA (25-30°C) aceleraron la SD, por encima de una T_b de 8°C. El modelo desarrollado por Bazin *et al.* (2011^a) no exploró el rango de valores de CH entre 5 y 10% que es el que habitualmente se establece en equilibrio con HR de la atmósfera entre 45-80% (Pixton y Warburton, 1971), y que refleja las condiciones de almacenaje más frecuentes en la industria semillera. En un trabajo reciente (Rodríguez *et al.*, 2018) se observó que el almacenaje a 25°C promovió la SD de aquenios en dos genotipos (una línea y un híbrido comercial) de girasol comparando con almacenaje a 5°C, y para un CH inicial cercano al 6% (base PS). Esto amplió el rango de respuesta positiva a la TA previamente descrito por Bazin *et al.* (2011^a), aunque solo consideró un nivel de CH y no evaluó posibles efectos de variaciones en este factor.

Las prácticas de acondicionamiento de la semilla híbrida comprenden el secado a un CH determinado (6-8%), limpieza, clasificación, “curado” (tratamientos con fitoterápicos) y finalmente embolsado. Luego del secado, las condiciones de almacenamiento de las

“semillas” no son severamente controladas, pudiendo ocurrir variaciones en la HR y temperatura del aire que a su vez producen variaciones en el CH de la semilla. Con el propósito de eliminar rápidamente la dormición en lotes de girasol que deben ser utilizados para una siembra inmediata (p. ej., en programas de mejoramiento), en la industria semillera suelen utilizarse algunas prácticas con base empírica. Por ejemplo, una de estas prácticas consiste en secar los frutos a un CH 8% y almacenar a 10°C por una semana antes de sembrar (comunicación personal). Estas condiciones que podrían promover la ruptura de la dormición sugieren una posible respuesta a la estratificación (frío y altos CH). Sin embargo, los CH en este caso son menores que los típicamente asociados con la respuesta de estratificación en otras especies (donde las semillas alcanzan ψ_w mayores en contacto con el suelo húmedo; Benech-Arnold *et al.*, 2012; Malavert *et al.*, 2020).

Los cambios que ocurren en los aquenios durante la post-maduración en seco (Basbous-Serhal *et al.* 2016; Chahtane *et al.* 2017) tienen un fuerte impacto en los eventos relacionados con la acción hormonal luego de la imbibición, actuando como un interruptor que definirá la ocurrencia o no de la germinación. En diferentes especies se ha observado que variaciones en los niveles de dormición durante el almacenaje implican cambios en el metabolismo de ABA y/o sensibilidad al ABA que se manifiestan en la semilla embebida. Los estudios con *Arabidopsis* y cebada muestran que las semillas embebidas con altos niveles dormición (recién cosechadas) y sin dormición luego de la post-maduración en seco exhiben diferencias en el metabolismo y la señalización de ABA (Bewley, 1997; Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Cadman *et al.*, 2006; Benech-Arnold *et al.*, 2006; Barrero *et al.*, 2009; Yazdanpanah *et al.*, 2017). Sin embargo, a diferencia de *Arabidopsis* y cebada, en girasol no hay evidencias claras que apoyen que cambios en el metabolismo de ABA en la imbibición se asocien con

la SD (tal como sugieren los resultados del Capítulo 3 de esta tesis). Paralelamente, la sensibilidad a esta hormona, evaluada como la inhibición de la germinación de embriones incubados en ABA exógeno, disminuyó progresivamente durante el almacenamiento en seco (Le Page-Degivry *et al.*, 1996), y se asoció con la distinta velocidad de SD de aquenios bajo TA contrastantes (5 vs. 25°C; Rodríguez *et al.*, 2018). Por lo tanto, las evidencias en girasol apoyan un rol clave de la vía de señalización del ABA y modificaciones en su funcionalidad durante la post-maduración en seco. Otras vías hormonales también podrían jugar un rol en los cambios en el nivel de dormición durante el almacenaje en seco, a través de interacciones con la vía del ABA. La germinación de los aquenios dormidos de girasol también puede promoverse mediante la adición de GA y etileno (Corbineau *et al.*, 2014). El etileno promovió la germinación de embriones de girasol inmaduros, mientras que la inhibición química de la biosíntesis de etileno o el bloqueo de sus receptores redujeron su germinación (Corbineau *et al.*, 1990). Este efecto del etileno podría implicar la atenuación de la vía de señalización de ABA (Xia *et al.*, 2019) y la posible reducción de los niveles de ABA, como ocurre en las semillas de *Arabidopsis* (Finkelstein *et al.*, 2008). De estas dos posibilidades, la segunda fue evaluada y descartada en el Capítulo 3 de esta tesis (Fig. 3.6.A).

Durante el almacenamiento en seco, las semillas no solo pueden cambiar de un estado de mayor a menor dormición, sino que también se deterioran y envejecen. Los efectos del CH y TA sobre la longevidad de las semillas han sido exhaustivamente estudiados en muchas especies, con el desarrollo de modelos predictivos de gran impacto práctico (Ellis y Roberts, 1980). La relación entre el CH de las semillas y la HR del aire con el que están en equilibrio termodinámico se puede describir mediante las isotermas de sorción. Estas isotermas a su vez son afectadas por la temperatura, mostrando el efecto de la temperatura sobre el CH de

las semillas aún bajo una misma HR. El uso de las isotermas de sorción se extiende al estudio de procesos asociados con la hidratación en diferentes materiales o sustancias, y es aplicable a estructuras biológicas como las semillas. Las isotermas de sorción pueden variar según la composición química (contenido de aceite), la temperatura, y fenómenos de histéresis de las semillas (adsorción/desorción de agua; Fig. 4.1, B, C, D). El conocimiento de las regiones de unión con el agua brinda la oportunidad de interpretar los diversos procesos bioquímicos que pueden ocurrir en las semillas en función del CH. Independientemente de los factores enumerados que modifican las isotermas, se pueden identificar tres zonas de sorción (Vertucci y Leopold 1986, 1987; Vertucci *et al.*, 1987; Fig. 4.1 A). La primera corresponde a una zona de respuesta empinada entre valores de CH que equilibran con muy bajas RH (0-20%), una segunda zona de respuesta lineal y menos pronunciada a lo largo de HR intermedias (20-65%) y finalmente una zona de grandes aumentos en los CH con altas HR (70-95%) (Bewley *et al.*, 2013). Estas tres zonas de sorción responden a distintas interacciones del agua con los componentes de la semilla. En la primera zona, las moléculas de agua están ligadas muy fuertemente a los sitios más polares o con carga eléctrica (grupos iónicos); en la segunda zona, comienzan a ocurrir uniones más débiles asociadas a sitios polares e hidrofílicos, y en la tercera zona hay uniones más débiles del tipo puente de hidrógeno entre moléculas de agua, formándose “capas” o agua libre. La fuerza de estas uniones se refleja como una entalpía descendente a medida que aumenta el CH (Vertucci y Leopold 1984, 1987).

Vertucci y Ross (1990) propusieron que a una HR dada, el agua en los tejidos de semillas con composiciones químicas variadas estará en un estado termodinámico similar. Este concepto, aplicado a la optimización de las condiciones de almacenaje para maximizar la

longevidad de las semillas en los bancos de germoplasma, fue superior con respecto al criterio previamente utilizado, basado solamente en el CH. Dado que la HR está estrechamente relacionada con la a_w , un término que describe la disponibilidad termodinámica del agua para las reacciones químicas ($HR/100 = a_w$), las isothermas de sorción del agua proporcionan un medio para relacionar el CH con los parámetros termodinámicamente más relevantes de la a_w y el ψ_w (Walters *et al.* 1998). Sin embargo, independientemente de la forma en que el agua esté ligada a un sistema, la medida en que

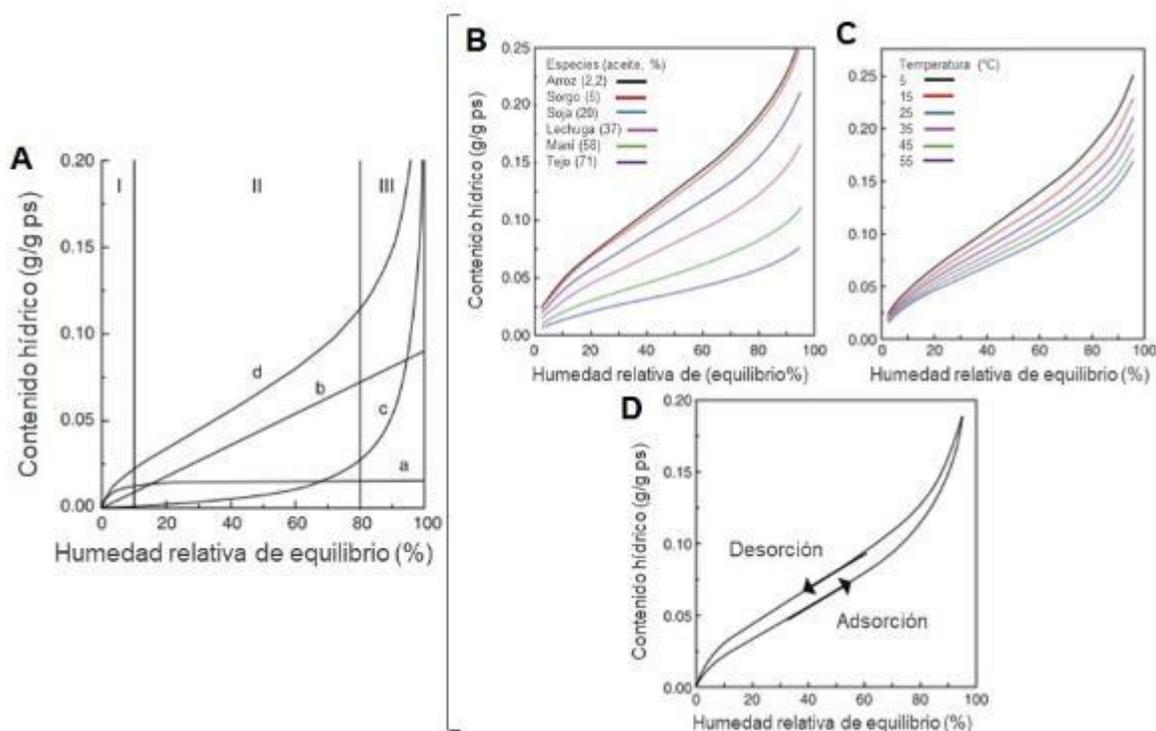


Fig. 4. 1. (A) Relación entre el CH de las semillas y la HRe (denomina isoterma de sorción de humedad). Según el modelo D'Arcy-Watt de las isothermas de sorción, la curva completa (d) se compone de tres subcomponentes principales. Los sitios de unión fuerte (curva a), entre el 10 y el 80-90% de HR, la unión débil del agua (curva b) y con una HR alta (<80%), el CH aumenta de forma pronunciada a medida que aumenta la HR (curva c). La suma de las contribuciones de estos componentes da lugar a la isoterma de sorción observada (curva d). Factores que modifican las isothermas: (B) La composición química de la semilla. Relación entre el CH de la semilla y la HRe para semillas de varias especies con distinto contenido de aceite (arroz -2,2%-, sorgo -5%-, soja -20%-, lechuga -37%-, maní -58%-, tejo-71%-). (C) Efecto de la temperatura. Relación entre el CH y la HRe para distintas temperaturas de almacenaje (5, 15, 25, 35, 45, 55°C). (D) Efecto de la histéresis. El fenómeno de pérdida de agua de la semilla (curva de desorción) difiere de la de ganancia (curva de absorción). Adaptado de Bewley *et al.* (2013).

sea capaz de realizar un trabajo (por lo tanto, capaz de afectar pérdida de dormición y/o deterioro de las semillas) dependerá de μ_w o ψ_w (Roberts y Ellis, 1989). Tanto el CH, HR y ψ_w tienen implicancias termodinámicas distintas, donde CH y HR (o a_w) no describen el efecto de la temperatura en las reacciones fisicoquímicas. Por lo tanto, ψ_w resulta ser la unidad de medida bioquímica y biofísicamente más relevante del potencial de reacciones en un ambiente acuoso a cualquier temperatura (Vertucci y Ross, 1993).

Aun cuando es mucho lo que se sabe con respecto a los eventos “post-imbibición” que caracterizan a las semillas dormidas y no dormidas, los eventos causales de estos cambios y que ocurren durante la post-maduración en seco siguen siendo objeto de debate. Debido al bajo CH con que habitualmente se equilibran las semillas (o frutos) ortodoxas durante el almacenaje “en seco”, se ha considerado improbable que los cambios en el nivel de dormición se deban a reacciones enzimáticas (Bewley *et al.*, 2013; Fernández-Marín *et al.*, 2013; Bailly *et al.*, 2008, 2019). Generalmente se asume que el citoplasma se encuentra en “estado vítreo” en el cual la muy limitada movilidad molecular impide la ocurrencia de reacciones enzimáticas, como se ha descrito con el ciclo de las xantófilas en un musgo tolerante a la desecación (Fernández Marín *et al.*, 2013). Sin embargo, la posibilidad de que algunas reacciones enzimáticas ocurran aún en el estado vítreo es sugerida por observaciones de algunos autores en el contexto de la preservación de alimentos deshidratados (Drapron, 1985). Alternativamente, se ha propuesto que la atenuación de la dormición durante el almacenaje en seco se debería a la ocurrencia de reacciones de oxidación de origen no-enzimáticas. Estas reacciones serían producidas por ROS que se forman espontáneamente en presencia de O_2 (p. ej. a través de la peroxidación de lípidos; Bailly *et al.*, 2008; Oracz *et al.*, 2007; Bazin *et al.*, 2011). La formación de ROS también puede ocurrir en ausencia de

O₂, como resultado de las reacciones Amadori-Maillard (Esashi *et al.*, 1993). La producción de ROS en ausencia de O₂ podría explicar el hecho de que la dormición se pierde aún en condiciones de anoxia (Buijs *et al.*, 2018). Más allá del origen de las ROS (y su formación en presencia/ ausencia de O₂), niveles elevados de ROS promueven la SD en semillas de girasol (Vigliocco *et al.*, 2020). Por ejemplo, tratamientos con oxidantes (como el metilviologen; Oracz *et al.*, 2007) o el almacenaje en hiperoxia (Morscher *et al.*, 2015; Buijs *et al.*, 2018) aceleraron la SD en semillas de girasol y *Arabidopsis*. A la vez, estas condiciones promueven el deterioro oxidativo de las semillas que conducen en un primer momento a la pérdida de vigor (como la capacidad para germinar rápida y uniformemente, produciendo plántulas normales bajo diversas condiciones ambientales) y posteriormente su viabilidad. Sin embargo, ambos procesos, pérdida de viabilidad y SD, podrían no estar acoplados y ocurrir a distintas velocidades, indicando que son afectados diferencialmente por las reacciones de oxidación (Bailly *et al.*, 2008, 2019; Chahtane *et al.*, 2016). Hasta el momento, la función de las ROS producidas durante el almacenaje en seco en la SD de las semillas sigue siendo incierta.

A favor de la posibilidad de que ocurran reacciones enzimáticas durante la post-maduración en seco, se encuentran los trabajos de Esashi y Zhang (Esashi *et al.*, 1993, 1997; Zhang *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000; Akimoto *et al.*, 2004) y más recientemente de Mira *et al.* (2010, 2016). Estos trabajos se basan en la detección y análisis de compuestos volátiles emitidos por las semillas almacenadas con bajo CH. La producción de compuestos volátiles (p. ej. metanol, etanol, acetaldehído, acetona) tienen origen en distintas reacciones químicas de origen enzimático de tipo fermentativas (Mira *et al.*, 2010, 2016) a pesar de no existir un metabolismo integrado en la semilla seca. Así como las reacciones de tipo oxidativo

causadas por ROS se ha propuesto que intervienen en el proceso de post-maduración y posterior deterioro, las reacciones de tipo enzimático podrían también estar involucradas en la pérdida de dormición en ciertas condiciones durante el almacenaje.

La posibilidad de manipular la velocidad de SD durante el almacenaje ofrece la posibilidad para abordar el estudio de los mecanismos fisiológicos detrás de la post-maduración en seco, como también una herramienta de importancia práctica para el manejo postcosecha en la industria semillera. Debido a la diversidad de fenotipos de dormición existentes en los girasoles cultivados (ver capítulo 2), se planteó la necesidad de indagar estas interacciones del CH y la TA en el almacenaje en dos genotipos. En particular se buscó explorar un rango de CH que cubra los valores habituales en condiciones experimentales e industriales (i.e., entre 4 y 10%). Los objetivos del trabajo presentado en este capítulo fueron (i) caracterizar la SD (y del posible deterioro oxidativo) de aquenios almacenados en diferentes combinaciones de CH (entre 4 y 10%, base PS) y TA, (ii) evaluar la ocurrencia de procesos asociados con el O₂ durante el almacenaje (consumo de O₂, peroxidación de lípidos) e (iii) identificar los cambios fisiológicos post-imbibición (sensibilidad de embriones al ABA) asociados a las respuestas observadas.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Material vegetal

Para evaluar el efecto de las condiciones de almacenaje sobre la SD se cultivaron dos genotipos con distintos “fenotipos” de dormición durante 3 años de experimentos: 600, de dormición intermedia-baja y 1579, de dormición intermedia-alta y TI a 30°C de incubación (ver Capítulo 2). Los genotipos se sembraron en el mes de octubre en 3 años

consecutivos (*experimento 6*: 10 de octubre de 2017 -1579 y 600-; *experimento 7*: 8 de octubre de 2018 -600-; *experimento 8*: 28 de octubre de 2019 -600-). La siembra en esta época expone al cultivo a un ambiente que maximiza los niveles de dormición al momento de cosecha (Riveira Rubin *et al.*, 2021). Los ensayos de campo se llevaron a cabo bajo siguiendo la metodología del Capítulo 2 (ver 2.2.1. *Material vegetal y experimentos a campo*). A madurez de cosecha (11% de CH) se recolectaron los capítulos, se trillaron de manera manual conservando los aquenios del tercio periférico (descartando los primeros dos radios) y medio, y finalmente se procedió al secado en secadoras experimentales con flujo de aire forzado a una temperatura de 35°C hasta lograr el CH objetivo (esto fue particular para cada experimento).

4.2.2. Aplicación de los tratamientos de almacenaje

Se utilizaron plantas que tuvieron similar fecha de R5.1. y se obtuvo una cantidad aproximada de 2-3 kg de aquenios. Este lote inicial cosechado se subdividió en 4 muestras (o sub-lotes) de igual cantidad (ca. 500 g) para generar los 4 niveles de CH. Este se determinó por el método gravimétrico. Uno de los sub-lotes se colocó en un contenedor con sílica gel (que se cambió diariamente) hasta alcanzar un CH de 4%. El procedimiento para obtener los niveles de CH fue variando entre los distintos años experimentales (Fig. 4.2). En el *experimento 6* (campaña 2017-2018) se secaron los 4 sub-lotes hasta 6%, uno de ellos se continuó secando en sílica hasta 4%, y otros dos se humedecieron en cámara húmeda (100% HR) hasta alcanzar valores de CH 8 y 10%. Todos los recipientes de “equilibrio” y el sub-lote de 6% se mantuvieron a 20°C hasta el inicio de los tratamientos de almacenaje. En el *experimento 7* (año 2018-19) y 8 (año 2019-



Fig. 4. 28. Esquema de métodos utilizados para alcanzar los CH objetivo para cada uno de los experimentos (6, 7 y 8). Se observa que se parte de una muestra con un CH inicial (11-12%) al momento de cosecha. En el *experimento 6* (genotipo 1579 y 600) se procedió a llevar a 6% en secadora, luego a 4% utilizando sílica gel (desorción), y a 8 y 10% a través de una cámara con HR 100% (adsorción). En el *experimento 7 y 8* (genotipo 600) las muestras se obtuvieron a través de un secado progresivo utilizando secadora (10, 8 y 6%) y sílica (4%; desorción).

20) se optó por ir retirando los sub-lotes de la secadora una vez alcanzados los CH objetivo y para la muestra de 4% se usó sílica gel.

Una vez alcanzados los cuatro CH objetivo, se prepararon submuestras de 10 g cada una en frascos de vidrio de 100 ml y se sellaron con tapones de goma, grasa selladora y Parafilm. Se almacenaron triplicados ($n=3$) de tratamientos (CH x TA) a temperaturas constantes de -18° y $+5, 10, 15, 20, 25$ y 30°C (-18 y 30°C se realizaron ocasionalmente) (ver [Imagen S. 4.2 B, C](#)). Además, se incluyeron dos tratamientos de las condiciones de almacenaje:

i. *Control de CH durante el almacenaje utilizando soluciones saturadas:* Frascos conteniendo granos y 4 ml de una solución saturada de sal de K_2CO_3 ($\text{HR}\approx 44\%$) y NaCl ($\text{HR}\approx 78\%$). La solución salina se colocó dentro de un tubo de hemólisis abierto en posición vertical dentro del frasco, de manera que el líquido no entrara en contacto directo con los ajenos, pero sí haya intercambio en fase vapor. El objetivo de estos tratamientos fue evaluar un posible efecto del método usado para lograr y mantener el CH durante el almacenaje, y así comparar con otros trabajos en la literatura (donde frecuentemente se usan

soluciones saturadas con sales para lograr y mantener CH determinados). Estos tratamientos a su vez se almacenaron en cámaras a 5 y 25 °C (*Experimento 6*).

ii. *Tratamiento de anoxia:* Se aplicaron inyectando N₂ gaseoso a presión dentro de los frascos a través de una cánula (aguja de jeringa) atravesando el tapón de goma, y dejando salir el aire por otra cánula inserta en el mismo tapón; se mantuvo un flujo de N₂ constante durante 1 min en cada frasco; luego se sellaron ambos orificios con esmalte (la presión excesiva se dejó salir antes de sellar). El objetivo fue desplazar el O₂ atmosférico dentro de los frascos para generar condiciones de anoxia durante el almacenaje. Estos tratamientos de anoxia se combinaron con tratamientos de CH 6 y 8% en el *experimento 6*, y con tratamientos de CH 4, 6, 8 y 10% en el *experimento 7*. Estos a su vez se almacenaron a 5 y 25 °C.

4.2.3. Monitoreo del contenido de humedad (CH) de los aquenios luego del almacenaje

Previo a cada ensayo de germinación se monitoreó el CH para cada réplica de cada uno de los tratamientos de almacenaje mediante método gravimétrico (ISTA, 1999). Se pesaron 10 aquenios con una balanza de precisión antes (PF) y luego (PS) del secado en estufa a 130°C durante 120 minutos (ISTA, 1999), expresando los valores de CH (%) en base seca:

$$CH(\%) = [(PF - PS)/PS]x100 \quad (3)$$

4.2.4. Evaluación del nivel de dormición: ensayos de germinación

El nivel de dormición se evaluó mediante ensayos de germinación incubando a dos temperaturas contrastantes dentro del rango térmico: 10°C, que favorece la expresión de dormición, y a 25°C (*experimento 7 y 8*) o 30°C (*experimento 6*), donde la dormición se expresa menos (ver capítulo 2, 2.3.2. *Análisis multivariado para los atributos de dormición*). Debido a que el rango térmico de incubación permisivo para la germinación se va ampliando a medida que la dormición disminuye, el uso de temperaturas contrastantes

amplía la posibilidad de distinguir niveles de dormición entre muestras que tienen un alto nivel de dormición (las diferencias se observarán mejor a 25°C) o muestras con bajos niveles de dormición (las diferencias se observarán mejor a 10°C). Estas temperaturas permiten el monitoreo del nivel de dormición (10 y 25°C), y de la TI (30°C) en aquellos genotipos que la presentan (p. ej. 1579). Para cada ensayo de germinación, se incubaron 25/20 unidades (aquenios, embriones) por caja de Petri con doble papel de filtro con 6 ml de agua destilada por unidad experimental durante 15 días de incubación en cámaras con control de temperatura. Se realizaron recuentos periódicos (2-3 días) de germinación retirando los aquenios/embriones germinados. Los ensayos de germinación se realizaron en 2-3 momentos durante el almacenaje (p.ej. 30, 70 días desde el almacenaje -DDA-).

i. *Ensayos de incubación de aquenios:* Se incubaron aquenios a dos temperaturas contrastantes dentro del rango térmico de incubación: 10° y 25° -*experimento 7 y 8-* o 10 y 30°C -*experimento 6-*). Se usaron 10 y 30°C cuando se evaluó TI en el 1579, y luego 10 y 25°C cuando se trabajó solo con el 600 para evaluar dormición (sin TI).

ii. *Ensayos de incubación de embriones:* Antes de incubar, se removió el pericarpio y se realizó un corte con bisturí de la cubierta seminal en la parte posterior (siguiendo la separación entre cotiledones); se dejaron incubando “semillas” hasta el día siguiente, donde fácilmente se removieron las cubiertas (testa y endosperma) y se dejaron los embriones incubando aislados.

iii. *Evaluación de la sensibilidad de embriones a ABA:* En paralelo a la incubación de embriones en agua, se incubaron embriones en ABA 5 µM (a 10°C en el *experimento 6* y a 25°C en el *experimento 7*).

4.2.5. Determinación de ABA endógeno por radioinmunoanálisis

Se siguió la metodología abordada en el Capítulo 3 (ver 3.2.3. *Determinación de ABA endógeno*). Las determinaciones de ABA se llevaron a cabo en el *experimento 7*, donde se tomaron muestras de 20 aqenios de los distintos tratamientos (4 CH y TA de 5, 15, 25°C) a los 70 DDA. En los tratamientos con cuatro CH y que se almacenaron a 5 y 25°C, se realizaron incubaciones de aqenios en agua destilada a 25°C durante 24 h para observar un posible metabolismo diferencial entre tratamientos.

4.2.6. Determinación del consumo de oxígeno (O₂) durante el almacenaje

Se cuantificó el nivel de O₂ dentro de cada frasco (cerrados herméticamente) donde fueron almacenados los aqenios (ver [Imagen S. 4.2 D, E](#)). Las mediciones se realizaron con microsensores (50 µm tips, Presens, Neurburg, Alemania; metodología según Domínguez *et al.*, 2019). Brevemente, para cada medición se introdujo la aguja conteniendo el microsensor a través del tapón de goma del frasco hermético conteniendo la muestra de aqenios; una vez estabilizado el valor de lectura (en mV), éste se registró. Durante las mediciones se controló la temperatura del ambiente (≈25°C) y se relativizó el valor obtenido de cada lectura a la señal obtenida para el sensor en contacto con el aire en el momento de la determinación (asumiendo una concentración de O₂ es del 21%).

4.2.7. Análisis de peroxidación de lípidos (TBARS) en ejes embrionarios provenientes de distintas condiciones de almacenaje

Como indicador del grado de deterioro oxidativo en aqenios almacenados bajo distintas condiciones de CH y TA se realizó un ensayo de TBARS (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico). El ensayo de TBARS es otro método para detectar la oxidación de lípidos. Este ensayo mide el malondialdehído (MDA), que es un producto fraccionado de un endoperóxido de ácidos grasos insaturados resultante de la oxidación de sustratos lipídicos. El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un cromógeno rosa

(TBARS), que se mide a 532–535 nm. A los 70 DDA se aislaron embriones de las cubiertas, se disectaron y pesaron los ejes embrionarios, que fueron molidos utilizando mortero y arena esterilizada. La extracción de las muestras molidas se hizo en ácido tricloroacético (TCA) 20% y luego se hizo reaccionar en TBA 0.5% en TCA 20% a 95°C, según protocolo de Heath y Parker (1968). Se utilizaron blancos de reacción con arena molida. Las sustancias reactivas del TBA se determinaron espectrofotométricamente a 532 nm y la absorbancia inespecífica se determinó a 600 nm, usando un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como (mg) de MDA por g de tejido seco.

4.2.8. Análisis de conductividad eléctrica (CE) en semillas

Para cada muestra evaluada, se sumergieron 25 semillas descascaradas (sin pericarpio) en 37,5 ml de agua desionizada ($< 2 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) a temperatura ambiente (25°C), de acuerdo con la metodología propuesta para girasol por Szemruck *et al.* (2015). Se midió la CE de la solución a las 24 h (a 25°C) utilizando un conductímetro portable Accumet AP85, expresando los resultados en $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (adaptado de Braz *et al.*, 2008). Las determinaciones se realizaron a los 70 DDA en frutos del genotipo 600 del *experimento 6*; se midió la CE en cada una de las 3 repeticiones de cada tratamiento de almacenaje, y se calculó el promedio y el EE.

4.2.9. Dormición persistente vs. pérdida de vigor a los 7 meses: Respuesta de aquenios no germinados a etefón; evaluación del vigor mediante peso fresco de plántulas

Se realizó un ensayo de germinación (E1) a 10°C de incubación a los siete meses de almacenaje (≈ 200 DDA) en el genotipo 600 del *experimento 6*. Luego de 14 d, para aquellos tratamientos donde los aquenios no germinaron, algunos de estos frutos se transfirieron a placas nuevas con solución etefón 100 μM , y otra parte se incubó en agua destilada retirando las cubiertas dejando el embrión aislado. En ambos casos se evaluó la germinación luego de

4 d (E2). Sobre las unidades germinadas para todos los tratamientos tanto en E1 y E2, se hicieron crecer las plántulas en bandejas plásticas con algodón y papel de filtro con agua destilada a 20°C suplementando con 16 h de luz blanca durante 4 d y pesaron en una balanza de precisión ([Imagen S. 4.1 A](#)). Además, para varios de los tratamientos de almacenaje (4, 6, 8, 10% a 5 y 15°C) se realizaron tinciones en 6 ml de tetrazolio 0,5% (ISTA, 2007) de aquenios en placas de Petri a 20°C (luego una previa imbibición de 4 h en agua destilada). Luego de las 24 h se evaluó en forma visual el nivel de tinción de los embriones removiendo el pericarpio y la cubierta seminal (en mayor medida la región del eje, [Imagen S. 4.1 B-D](#)).

4.2.10. Construcción de isotermas de sorción para aquenios del genotipo 600. Uso de estas para estimar la HRe y valores de ψ_w para aquenios almacenados bajo distintas condiciones

A partir de una muestra de aquenios (genotipo 600) almacenadas en freezer con CH de 3,5%, se generaron submuestras con distintos niveles de CH objetivo (\approx 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11%, bs). Para ello se humedeció la muestra inicial a CH 20% (en cámara húmeda con HR 100%) y luego se fue secando en secadora experimental hasta 6% y luego en una cámara con sílica gel. Las submuestras se fueron retirando y guardando en bolsas herméticas a medida que alcanzaban el CH objetivo (evaluando el PF de cada muestra). De esta forma, las muestras se obtuvieron por desorción, simulando en alguna medida el proceso de secado progresivo en planta y luego de la cosecha. Las submuestras de aquenios se colocaron en recipientes de vidrio de 150 ml herméticos (20-22 gramos), que contaban con un sensor de HR y temperatura (DHT22 Arduino) sobre la parte interna de la tapa del recipiente ([Imagen S. 4.2 F, G](#)). Los frascos se colocaron en cámaras de temperatura controlada a -18°C (freezer), +5, 10, 15, 20, 25 y 30°C (se fueron moviendo secuencialmente de a una temperatura a la vez). Se siguió la dinámica de HR y se determinó un valor una vez estabilizado que fue dentro de

las primeras h de transferidos los frascos de una temperatura a otra. A partir de estos datos se obtuvieron las isotermas de sorción, mediante ajuste de un modelo polinómico de tercer grado para los datos de CH en función de HR para distintas TA (ver dinámicas e isotermas en la [Fig. S. 4.6](#) A, B). A partir dichas isotermas, se obtuvo el valor estimado de HR (a_w) por el modelo para las muestras usadas en el *experimento 8*, de acuerdo con su CH y la TA.

4.2.11. Análisis estadístico

Los datos de porcentaje final de germinación obtenidos para los triplicados de cada tratamiento de almacenaje se promediaron, y este único valor se muestra con su EE (utilizando el programa GraphPad Prism 7 para la visualización de los datos, Motulsky, 2003). Los resultados de CH alcanzados para las distintas TA, mediciones de oxígeno, CE y TBARS se analizaron mediante ANOVA de acuerdo con un diseño de arreglo factorial, con un nivel de significancia de 5% y test de Tukey para separación de medias, utilizando el software InfoStat (versión 2018, grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) asistido por R Statistics (R Core Team, 2017).

También, se realizaron regresiones lineales para la germinación de aquenios en agua en función de la germinación de embriones en ABA y contenido endógeno de ABA en ejes disectados calculando los coeficientes R^2 , r y valor p .

Conjuntamente, se elaboró un modelo conceptual de la TSDR y la TDR (o pérdida de viabilidad) en función del ψ_w y HRe de los aquenios durante el almacenaje con los datos del *experimento 8*.

Las TSDR se obtuvieron ajustando regresiones no lineales tipo Gompertz entre el porcentaje de germinación final de aquenios en función de los DDA utilizando el software GraphPad Prism 7, tanto para la incubación a 10° como a 25/30°C en cada uno de los tratamientos de

CHxTA. Se obtuvo el T_{50} , y se calculó la tasa de SD a partir de su inversa ($1/T_{50}$). A continuación, esta tasa se relativizó al tratamiento de almacenaje con mayor tasa obtenida.

La TDR se obtuvo a través de la función de viabilidad de Ellis y Roberts (1980) con los parámetros ajustados para la especie girasol, despejando la cantidad de p días para obtener una germinación del 50% de la población, y luego se obtuvo la tasa calculando la inversa ($1/p$). La ecuación de viabilidad se obtiene:

$$v = Ki - \frac{1}{10^{Ke - Cw \cdot \log(CH) - Ch \cdot TA - CqTA^2}} \quad (4)$$

donde v es la germinación (probit) después de p días de almacenaje, K_i la germinación inicial (probit), CH el contenido de humedad, TA la temperatura de almacenaje y K_e , C_w , C_h y C_q constantes específicas de la especie (6.74, 4.16, 0.0329, 0.000478 respectivamente).

El ψ_w se calculó a partir de estos valores de HR y temperatura (obtenidos de las isotermas de sorción del genotipo 600) según Vertucci y Roos (1993) y/o Ellis *et al.* (1989):

$$\psi_w = \frac{[RT \ln(HR/100)]}{V_w} \quad (5)$$

donde R es el contenido de gas ideal (8,3143 J/mol.K) , T es la temperatura en °Kelvin, y V_w es el volumen molar parcial del agua (18,015 cm³mol⁻¹). A partir de los valores de HR e ψ_w , se elaboró un gráfico de coordenadas (x, y) para los valores de la TSDR y TDR (ajustando un modelo exponencial) de los aqenios durante el almacenaje.

4.3. Resultados

4.3.1. Contenido hídrico de los aqenios durante el almacenaje

Para los distintos tratamientos de almacenaje -combinaciones de CHxTA- los valores de CH se mantuvieron similares a los valores “objetivo” iniciales en cada caso, con leves

fluctuaciones en algunos tratamientos durante el almacenaje. Estas fluctuaciones se deberían al intercambio de agua entre la muestra y el aire del contenedor, hasta alcanzar el equilibrio termodinámico entre ambas fases (igual potencial entre el agua adsorbida de la muestra y en la fase vapor dentro del frasco), afectado por la TA. Dependiendo de los CH iniciales y de la HR ambiente con la cual fueron almacenadas los aquenios en los frascos, los distintos tratamientos tuvieron fenómenos de adsorción (menores CH, p. ej. 4%), o desorción (CH mayores, p. ej. 8, 10%). Los cambios fueron leves o nulos para las muestras con CH 6% dado que ya se encontraba cerca del valor de equilibrio con el aire al cerrar el frasco. Los valores de CH durante el almacenaje (i.e., comparando 30 y 70 DDA) se mantuvieron casi constantes (excepto algunas fluctuaciones leves y erráticas) para ambos genotipos (1579 y 600) y 3 años de experimento (Fig. 4.3). Por otro lado, se observaron fluctuaciones en el CH entre muestras de un mismo CH “objetivo” almacenadas a diferentes TA, aunque sin una tendencia clara. Para las muestras de un mismo CH objetivo, la dispersión de los valores de CH en torno al valor medio fue menor o igual a 0.4 %. En el *experimento 6*, por ej., el genotipo 600 a los 70 DDA, los valores de CH alcanzaron entre 4,1-4,9% (4%), 6,1-6,8% (6%), 7,9-8,4% (8%) y 9,9-10,4% (10%). Por otro lado, el genotipo 1579 a los 77 DDA las fluctuaciones estuvieron entre 4,6-5,2% (4%), 6-6,7% (6%), 8-8,3% (8%) y 9,9-10,6% (10%). Luego, en el *experimento 7*, el genotipo 600 a los 70 DDA, dichas fluctuaciones estuvieron en el rango de 4,7-5% (4%), 6,6-6,8% (6%), 7,8-8,2% (8%) y 9,8-10,3% (10%). En el *experimento 8*, el genotipo 600 a los 60 DDA, las fluctuaciones estuvieron en torno al 4-4,3% (4%), 6,4-6,8% (6%), 7,8-8,2% (8%) y 10,3-10,8% (10%). Esto nos permite ver que, para los 3 años de experimentos y ambos genotipos, los menores CH objetivo (principalmente 4%) fueron los que tuvieron mayores fluctuaciones (aunque no llegaron a superar el 1%), y en menor medida

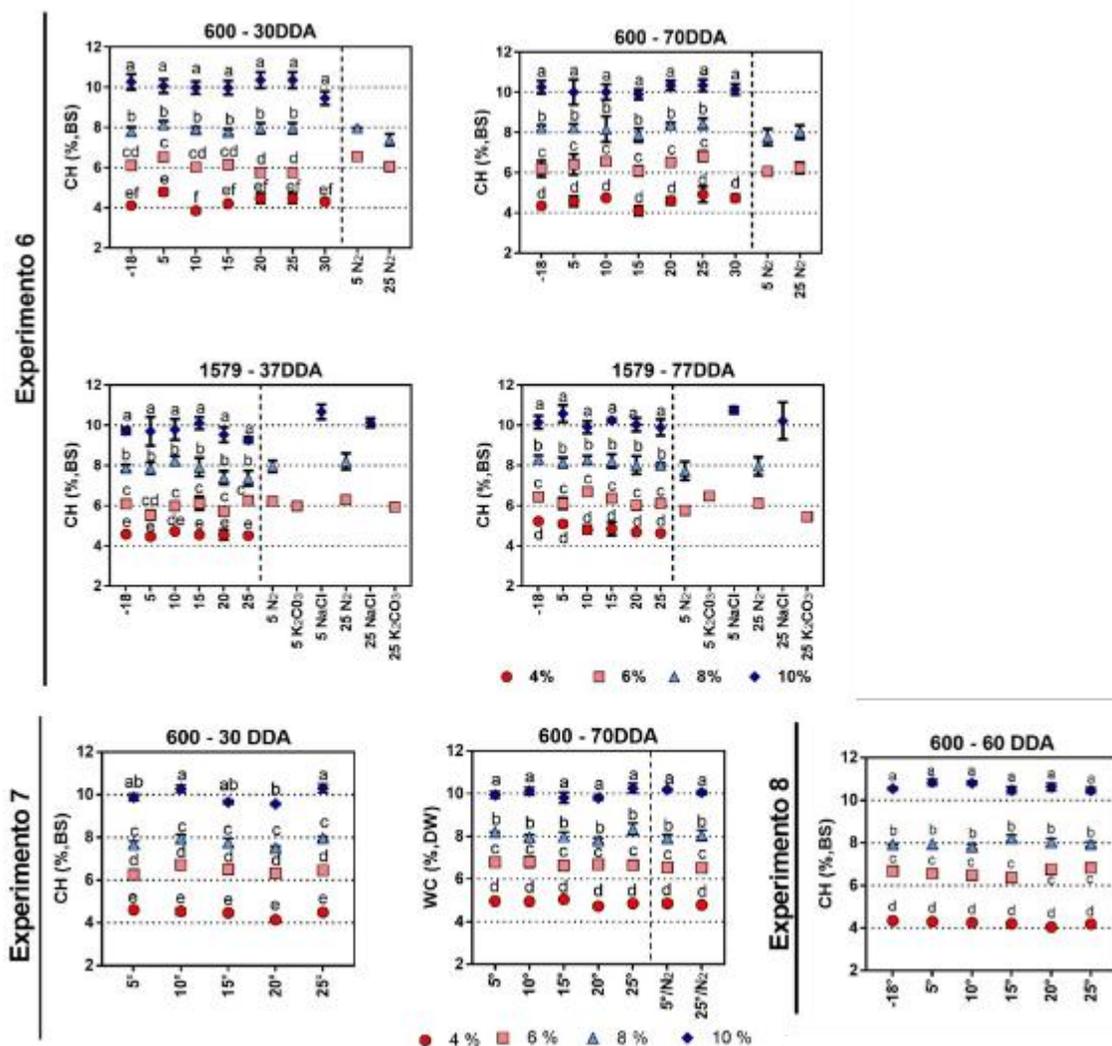


Fig. 4. 55. Contenido de humedad para los tratamientos de almacenaje. Las líneas punteadas horizontales representan el valor de CH objetivo (4, 6, 8 y 10%) y cada punto representa el valor logrado durante el almacenaje (media \pm EE; n=3). Sobre el eje de las abscisas se muestran las distintas TA (-18, 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) a las cuales fueron almacenadas cada una de los CH y tratamientos control: Sales saturadas (NaCl y K₂CO₃) y con nitrógeno (N₂). Se muestran 3 años de experimentos (6, 7 y 8) y distintos momentos durante el almacenaje (DDA) sobre distintos genotipos: Experimento 6, 600 y 1579; experimento 7 y 8, 600. Los valores p tanto para interacción y efectos principales se muestran en el Cuadro S. 4.1.

para 6, 8 y 10%. Las diferencias entre los tratamientos logrados de CH fueron significativas (ver [Cuadro S. 4.1](#)). Finalmente, para los controles en atmósfera de hipoxia (desplazamiento de O₂ con N₂ gaseoso) y con sales saturadas (K₂CO₃ y NaCl) los CH logrados también fueron similares a los valores objetivo en cada caso.

4.3.2. Efectos del CH, la temperatura y el tiempo de almacenaje sobre la germinación de aquenios y embriones.

Los tratamientos de almacenaje tuvieron un fuerte impacto en la respuesta de germinación de los aquenios y embriones. Aunque se observaron importantes interacciones entre ambos factores (CHxTA), los patrones observados fueron similares en los dos genotipos evaluados, 600 y 1579, como se puede observar en las Fig. 4.4 y 4.5, respectivamente. En cada panel (A-P) se muestran los valores de germinación final en función de la TA para un mismo nivel de CH (referidos de acuerdo con el CH objetivo; 4, 6, 8 y 10%). Se muestran, además, los resultados obtenidos en dos momentos luego de iniciado el almacenaje (30 y 70 DDA, para 600; y 37 y 77 DDA para 1579), y a dos temperaturas de incubación (30 y 10°C). Los valores de germinación de aquenios y embriones (ambos en agua) previos al inicio del almacenaje se muestran con línea punteada en cada panel; las variaciones con respecto a estos valores iniciales en cada caso permiten inferir cambios en el nivel de dormición luego del almacenaje, así como posibles efectos del tratamiento de imposición del CH sobre la dormición al inicio del almacenaje. A continuación, se presentan y analizan los resultados para el genotipo 600, y posteriormente para 1579, destacando los patrones comunes.

4.3.2.1. Resultados del Experimento 6 - genotipo 600

El procedimiento para lograr cada nivel de CH objetivo en el genotipo 600 tuvo un impacto en los niveles iniciales de dormición, inferidos a partir de los datos de germinación de aquenios (a 30°C de incubación) y de embriones (a 10°C de incubación; ver líneas horizontales de corte del eje “y” en la Fig. 4.4). Los aquenios con mayores valores de CH (8 y 10%) mostraron un nivel inicial de dormición mayor que los aquenios que se secaron a CH 6%; estos últimos germinaron 75% al inicio del almacenaje, mientras que los de CH 8 y 10%

no superaron el 25% de germinación. Por otro lado, los akenios que se secaron a CH 4% presentaron el mayor nivel de dormición al inicio del almacenaje. Esto pone en evidencia que la pérdida de dormición avanzó durante los 20 d que se demoró en alcanzar los valores de CH objetivo más elevados (primero se secaron todas las muestras a CH 6% y luego se pusieron en cámara húmeda las que se humedecieron hasta valores de CH 8 y 10%; todo se mantuvo a 20°C). Esto sugiere un efecto significativo del CH sobre la SD; ésta parece inhibirse en akenios con altos niveles de CH (8 y 10%) pero también cuando los valores de CH son muy bajos (4%). A 10°C de incubación, también se observó un efecto del CH sobre la germinación inicial, principalmente en los embriones (la germinación de akenios fue nula). Aunque la germinación inicial de embriones fue similar ($\approx 70\%$) entre tratamientos de CH 6, 8 y 10%, el secado a CH 4% mantuvo una mayor dormición inicial (germinación $\approx 25\%$). Esto resalta la importancia de evaluar dormición a más de una temperatura de incubación. Este efecto del CH, como se verá a continuación, muestra además fuertes interacciones con la TA.

En akenios almacenados con CH 4%, la SD fue promovida por TA entre 20 y 30°C (Fig. 4.4 -A, E, I, M-). Por el contrario, los niveles de germinación de akenios y de embriones se mantuvieron sin cambios (con respecto a los iniciales) cuando la TA fue igual o menor a 15°C incluso hasta los 70 DDA. La germinación de embriones a 10°C de incubación también fue promovida por TA entre 20 y 30°C. Esta menor dormición embrionaria a 10°C se puede asociar con una menor susceptibilidad a la inhibición por cubiertas observada a 30°C de incubación (donde los embriones germinaron con valores altos desde el inicio en este experimento y para todas las TA). El efecto de la TA sobre la germinación de los akenios incubados 30°C fue notable, con valores que variaron de 0% para akenios almacenados a

15°C, hasta 100% para aquellos almacenados a 30°C (tanto a los 30 como a los 70 DDA). Esta diferencia también se observó para la incubación a 10°C, aunque con un retraso temporal (a los 70 DDA; ver paneles E y M). Aun cuando la germinación de embriones aumentó entre 30 y 70 DDA (*ca* 100% a los 70 DDA; panel M), la germinación de embriones en 5 μ M ABA (evaluada solamente a 10°C de incubación) se mantuvo totalmente inhibida para todas las

GENOTIPO 600

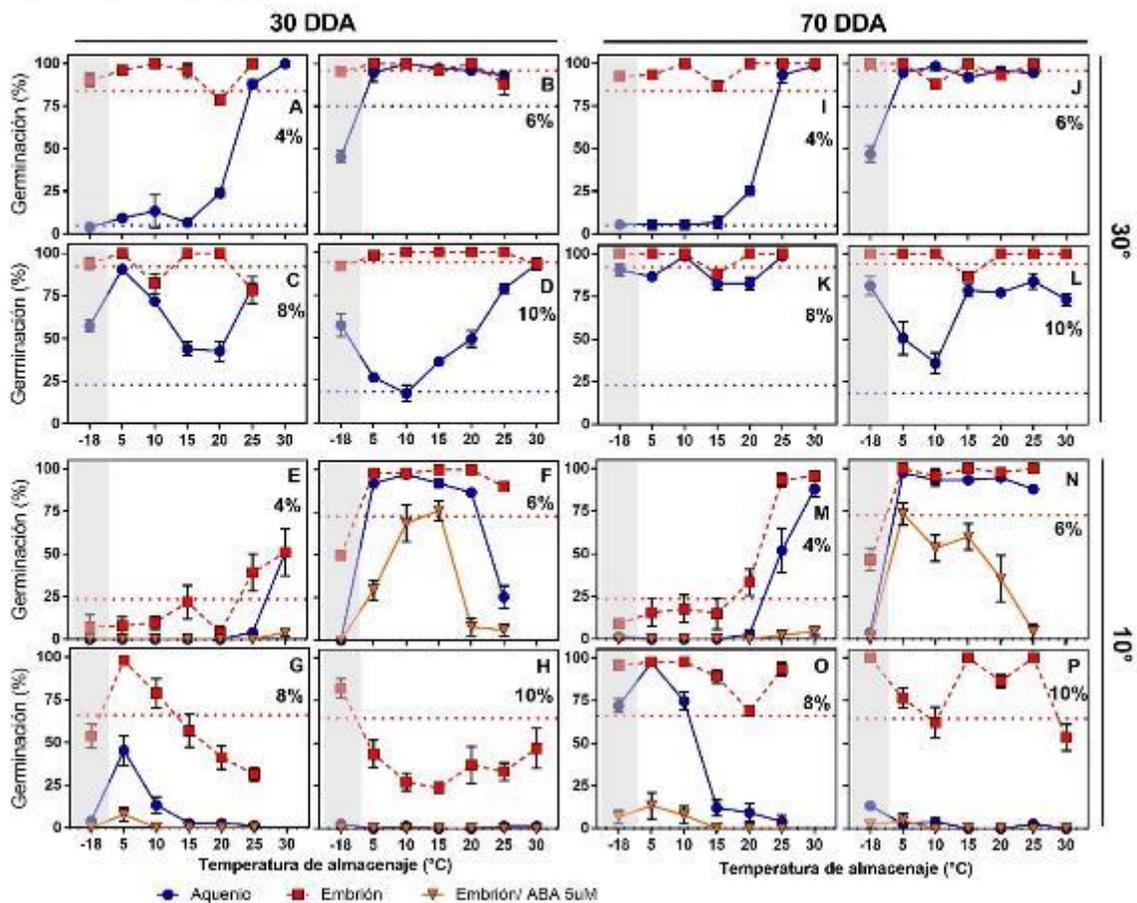


Fig. 4. 82. Porcentaje final de germinación de aquenios (círculos y líneas llenas azules), embriones (cuadrados y líneas punteadas rojas) y embriones incubados en ABA 5 μ M (triángulos y líneas naranjas) en función de la TA (-18, 5, 10, 15, 20, 25, 30°C) para distintos CH de los aquenios (4 - A,I,E,M-, 6 -B,J,F,N-, 8 -C,K,G,O- y 10% -D,L,H,P-). Además, se muestran dos temperaturas de incubación (10° -E,F,G,H,M,N,O,P- y 30°C -A,B,C,D,I,J,K,L-) y dos momentos durante el almacenaje (30 -A:H- y 70 DDA-I:P-) en el genotipo 600 del *experimento 6*. Las líneas punteadas de intersección sobre el eje “y” representan la germinación de aquenios (líneas azules) y embriones (líneas rojas) antes del almacenaje para cada CH. Cada punto representa la media \pm EE (n=3).

TA, evidenciando una alta sensibilidad al ABA.

La germinación de aquenios almacenados con CH 6% (paneles B, F, J, N) fue máxima para todas las TA entre 5 y 25°C, cuando se evaluó incubando a 30°C (paneles B y J). Sin embargo, a 10°C de incubación se evidenciaron diferencias en la germinación asociadas con la TA. Según la germinación de aquenios a 10°C, el rango óptimo de TA para promover la SD fue de 10 a 20°C, y la respuesta de germinación de embriones en ABA acotó este rango aún más, a TA entre 10-15°C. Fuera de este rango “óptimo”, la SD se retrasó cuando la TA disminuyó (5°C) pero también hacia TA mayores (20 y 25°C). Esto se observó como un mayor tiempo en alcanzar el 100% de germinación (que ocurrió a los 70 DDA, panel N), y también como una mayor sensibilidad de los embriones al ABA (paneles F y N). Para la TA -18°C (almacenaje en congelador) pareció inhibirse por completo la SD. Adicionalmente, para este tratamiento (CH 6% - TA -18°C) la menor germinación de aquenios a 30°C (para 30 DAA; panel B) con respecto al valor inicial, así como la menor germinación de embriones a 10°C (panel F), sugieren una caída en el vigor o un refuerzo de la dormición embrionaria como consecuencia de la muy baja temperatura combinada con un CH 6%.

En los aquenios con CH 8% (paneles C, G, K, O), la SD de aquenios fue promovida por TA entre 5°C y 20°C, y mostró una respuesta negativa a la TA (evidente tanto a 30 como a 10°C de incubación; paneles C y G). Sin embargo, a 30°C de incubación (panel C), esta respuesta negativa a la TA se revirtió para la TA 25°C (la germinación de aquenios aumentó de 40% para TA 20°C, a casi 80% para TA 25°C; panel C). Por otro lado, la germinación de embriones en agua a 10°C (panel G) también mostró una respuesta negativa a la TA a los 30 DDA, en este caso evidente en todo el rango de 5 a 25°C. Sin embargo, para las TA de 20 y 25°C, la germinación de embriones disminuyó con respecto al valor inicial (panel G; línea punteada) sugiriendo una posible pérdida de vigor o un refuerzo de la dormición embrionaria. A los 70

DDA la germinación de embriones aumentó y superó el valor inicial, indicando que la SD prosiguió. Por lo tanto, el almacenaje a TA 25°C parece haber promovido una pérdida de vigor (observada en embriones incubados a 10°C) al mismo tiempo que se promovió la SD (manifestado más claramente a 30°C de incubación). La germinación de embriones en agua (incubados a 10°C) aumentó entre 30 y 70 DDA, sugiriendo que la dormición embrionaria disminuyó para todas las TA; sin embargo, la germinación de los aquenios a 10°C se mantuvo fuertemente inhibida para las TA de 15 a 25°C (panel O). Esto estuvo acompañado por una fuerte sensibilidad al ABA para todas las TA. Notablemente (y en contraste con los tratamientos de CH 4 y 6%), la SD también ocurrió durante el almacenaje en freezer (TA -18°C), como se puede inferir a partir del aumento en la germinación a los 30 DDA (a 30°C de incubación) y a los 70 DDA (a 10°C de incubación).

En aquenios almacenados con CH 10% (paneles D, H, L, P), la germinación mostró una respuesta bimodal a la TA a los 30 DDA (panel D), con un mínimo para la TA 10°C. En el rango de -18°C a +10°C, se observó una respuesta negativa a la TA similar a la exhibida por aquenios con CH 8%, pero con un desplazamiento hacia TA menores. Para el rango de TA entre 15 y 30°C, esta respuesta se invirtió y mayores TA promovieron la SD, con mayores niveles de germinación de aquenios a 30°C (panel D). A 10°C de incubación, la germinación de aquenios fue prácticamente nula en todo el rango de TA, incluso a los 70 DDA. De manera similar, la germinación de embriones (panel P) aumentó entre 30 y 70 DDA, hasta igualar o superar el valor inicial (según la TA). Nuevamente se esbozó un patrón de respuesta bimodal, con un mínimo en TA de 10°C.

Estos resultados sugieren que los niveles de germinación de los aquenios dependen del aporte simultáneo de dos componentes diferentes: el nivel de dormición y el vigor. Tanto una mayor

dormición, como un menor vigor, pueden causar una menor germinación. Estos resultados por sí solos no permiten aun distinguir entre ambos procesos (pérdida de vigor o cambios en el nivel de dormición), pero sugieren que, en diferentes rangos y combinaciones de CH y TA, ambos procesos pueden operar de manera simultánea. Debido a que las diferentes condiciones de almacenaje parecen afectar diferencialmente a cada uno de estos dos procesos, la interpretación de su ocurrencia es compleja. La posibilidad de evaluar el deterioro requiere de determinaciones particulares que se mostrarán más adelante en este capítulo.

4.3.2.2. Resultados para el Experimento 6 - genotipo 1579

En términos generales, las respuestas observadas para el material 1579 fueron similares a las descritas en el genotipo 600, con algunas diferencias asociadas con los mayores niveles de dormición y con la presencia de TI (Fig. 4.5). La amplitud de los cambios en el nivel de dormición en respuesta a los tratamientos de almacenaje para este genotipo fue mayor durante la incubación a 10°C, debido a que la presencia de TI impidió que la germinación de achenios supere el 75% cuando la incubación se realizó a 30°C. De manera similar al genotipo 600, la línea 1579 evidenció una aparente caída de la germinación de embriones durante el almacenaje respecto al valor inicial con CH bajos (4 y 6%) combinados con bajas TA (<15°C para CH 4%, panel A; y TA -18°C para CH 6%; panel F).

En achenios almacenados con CH 4%, la SD (reflejada en el aumento del porcentaje germinado de embriones y de achenios a los 33 y 77 DDA; Fig. 4.5, paneles A e I) avanzó parcialmente cuando las TA fueron de 20 y 25°C, y solamente se pudo observar a 30°C de incubación (a 10°C no hubo germinación de achenios y embriones). Al contrario, cuando la TA fue igual o menor a 15°C se mantuvo una baja germinación de achenios y embriones

tanto a 37 como a 77 DDA, a 10 y 30°C de incubación. Esto pudo deberse a un menor vigor y/o un aumento en el nivel de dormición. En aquenios con CH 6%, la SD se promovió fuertemente por TA entre 10 y 20°C, con un óptimo cerca de TA 15°C. Esto se observó en la respuesta de germinación de frutos incubados a 10 y a 30°C, y también en la respuesta de embriones en ABA (panel F). Por fuera de este rango “óptimo”, la SD disminuyó a TA 5 y

GENOTIPO 1579

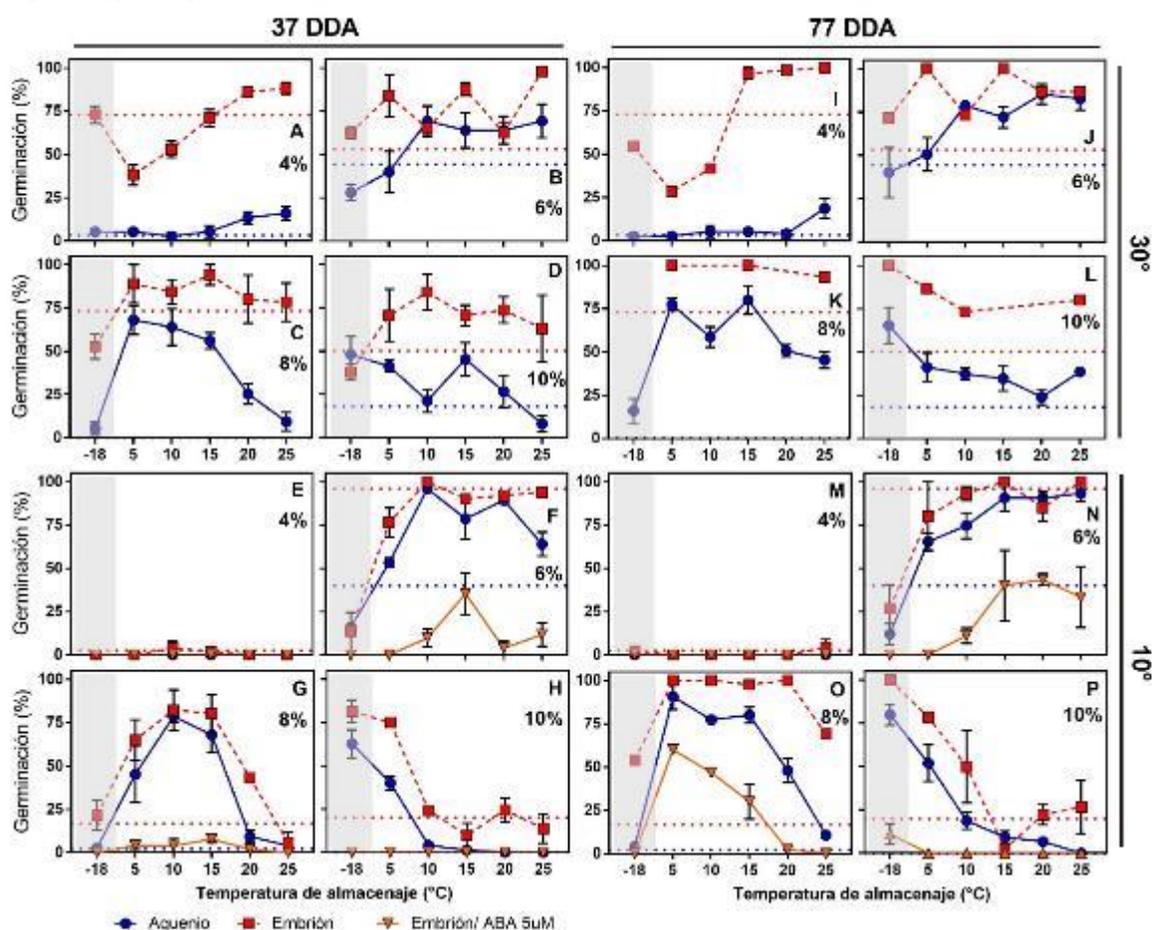


Fig. 4. 109. Porcentaje final de germinación de aquenios (círculos y líneas llenas azules), embriones (cuadrados y líneas punteadas rojas) y embriones incubados en ABA 5µM (triángulos y líneas naranjas) en función de la TA (-18, 5, 10, 15, 20, 25°C) para distintos CH de los aquenios (CH 4% - A,I,E,M-, 6% -B,J,F,N-, 8% -C,K,G,O- y 10% -D,L,H,P-). Además, se muestran dos temperaturas de incubación (10°C -E,F,G,H,M,N,O,P- y 30°C -A,B,C,D,I,J,K,L-) y dos momentos durante el almacenamiento (37 -A:H- y 77 DDA-I:P-) en el genotipo 1579 del *experimento 6*. Las líneas punteadas de intersección sobre el eje “y” representan la germinación de aquenios (líneas azules) y embriones (líneas rojas) antes del almacenamiento para cada CH. Cada punto representa la media \pm EE (n=3).

25°C, haciéndose nula a TA -18°C. Cuando los CH fueron de 8%, los niveles de germinación mostraron un patrón de respuesta negativo a la TA (similar al 600) entre 5 y 25°C, con un óptimo entre 5 y 10°C. La germinación de aquenios no aumentó durante el almacenaje a -18°C, aunque el aumento de los embriones (incubados a 10°C) a los 77 DDA sugiere una pérdida parcial de la dormición durante el almacenaje en freezer (panel O). Finalmente, con CH de 10% la SD de aquenios fue promovida principalmente por el almacenaje en freezer (-18°C) y se demoró a temperaturas crecientes hasta una TA de 15°C. Por encima de esta TA, la germinación (tanto de aquenios como de embriones a 10°C) mantuvo niveles bajos y cercanos a los valores iniciales.

4.3.2.3. Resultados para los Experimentos 7 y 8 – genotipo 600. Tasas de SD

Los *experimentos 7 y 8* se realizaron solamente con la línea 600 (Fig. 4.6, 4.7). Debido a que este genotipo no presenta TI, las incubaciones se realizaron a 10 y 25°C (en vez de 30°C) para observar cambios solamente en la DEBT. El objetivo de estos experimentos fue, además de corroborar los resultados del experimento anterior, evaluar un posible efecto del método usado para generar los CH más elevados (8 y 10%). A diferencia del *experimento 6*, los distintos tratamientos de CH se obtuvieron a partir del secado progresivo del lote de aquenios recién cosechados; los tratamientos de CH 8 y 10% se alcanzaron por desorción, y no por rehidratación (adsorción) de muestras previamente secadas a un CH menor (como se hizo en el *experimento 6*). En el *experimento 7*, las TA fueron de 5-25°C y no se incluyó el almacenamiento en freezer (-18°C). En el *experimento 8*, se volvió a incorporar la TA de freezer y se evaluó solamente la germinación de aquenios (sin incluir embriones), donde el propósito de este experimento fue aportar al desarrollo de un modelo conceptual de SD para aquenios de girasol.

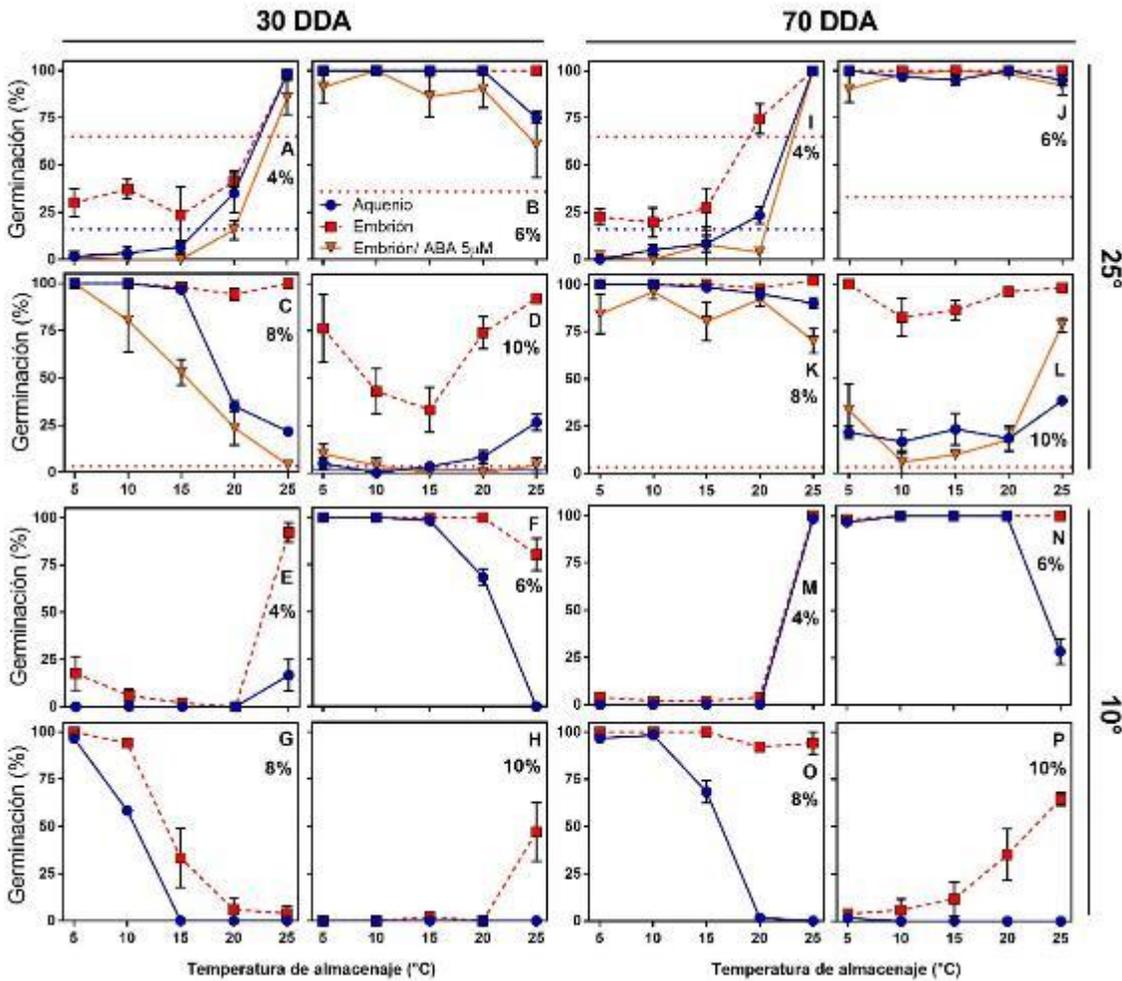


Fig. 4.136. Porcentaje final de germinación de aquenios (círculos y líneas llenas azules), embriones (cuadrados y líneas punteadas rojas) y embriones incubados en ABA 5µM (triángulos y líneas naranjas) en función de la TA (5, 10, 15, 20, 25°C) para distintos CH de los aquenios (4 -A,I,E,M-, 6 -B,J,F,N-, 8 -C,K,G,O- y 10% -D,L,H,P-). Además, se muestran dos temperaturas de incubación (10° -E,F,G,H,M,N,O,P- y 25°C -A,B,C,D,I,J,K,L-) y dos momentos durante el almacenaje (30 -A:H- y 70 DDA-I:P-) en el genotipo 600 del *experimento 7*. Las líneas punteadas de intersección sobre el eje “y” representan la germinación de aquenios (líneas azules) y embriones (líneas rojas) antes del almacenaje para cada CH. Cada punto representa la media ± EE (n=3).

En el *experimento 7* los niveles de dormición iniciales variaron según el CH de la muestra (Fig. 4.6). Los niveles de dormición fueron mayores que en el *experimento 6* debido (al menos en parte) a que el tiempo en el alcanzar los valores de CH objetivo fue menor (4 días vs. 20 días en el *experimento 6*). El porcentaje de germinación de embriones a 25°C de incubación fue mayor con CH de 4 % ($\approx 70\%$) seguido por 6% ($\approx 30\%$), y cercano a 0% en

aquenios con CH 8 y 10%. Esto indica que la deshidratación (al menos hasta CH 4% en este genotipo) tiene un efecto inmediato en el nivel de dormición. Durante el almacenaje, los patrones de respuesta a la TA dentro de cada nivel de CH fueron similares a los descriptos en el *experimento 6*. El CH 6% fue el que permitió alcanzar los mayores niveles de germinación a los 30 DDA tanto de aquenios como de embriones, con un rango de TA óptimas entre 5 y 15°C, y una respuesta negativa a TA mayores. En frutos con CH 8% la velocidad de SD se redujo a TA crecientes. Esta respuesta negativa también se observó en aquenios con CH 10% para TA menores entre 5 y 10°C, y se invirtió para TA crecientes entre

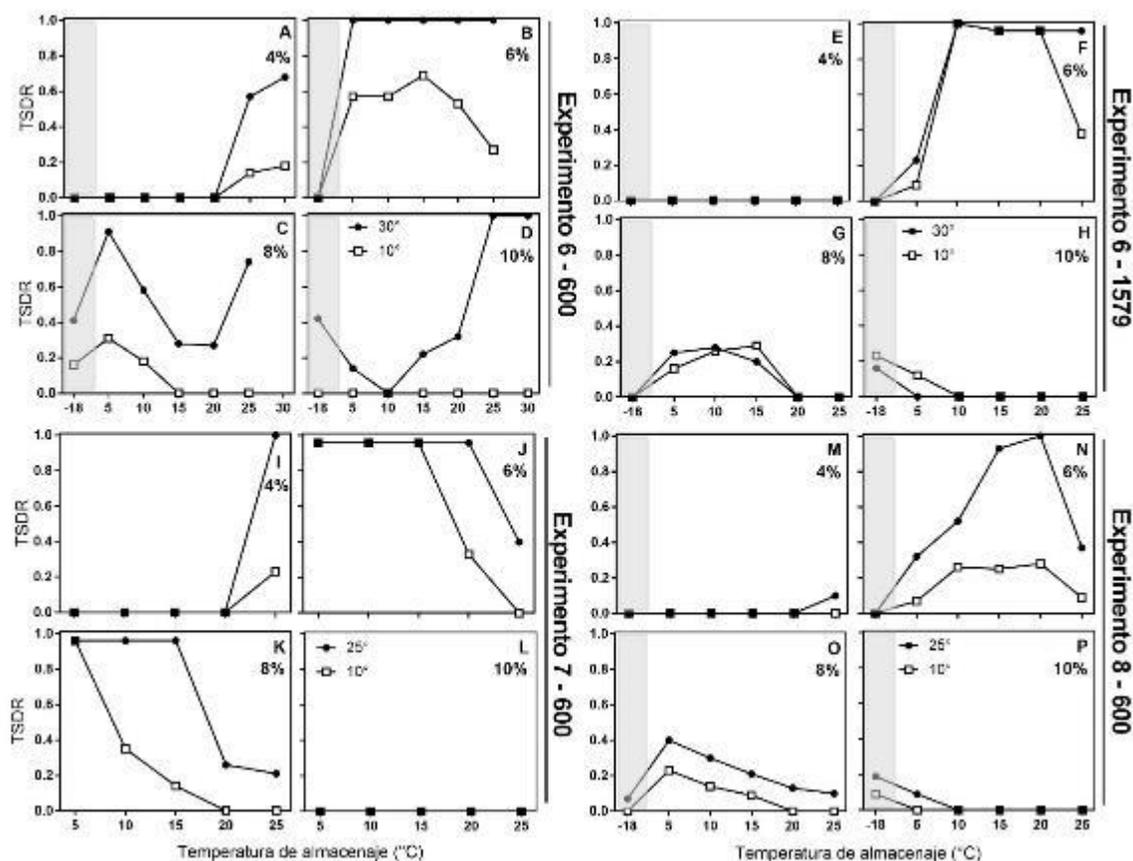


Fig. 4. 163. Tasa de SD relativa (TSDR) de los aquenios durante el almacenaje según la TA (5, 10, 15, 20, 25 y eventualmente -18, 30°C) y el CH (4 -A,E,I,M-, 6 -B,F,J,N-, 8 -C,G,K,O- y 10% -D,H,L,P-). Las líneas representan las temperaturas de incubación a 25/30°C (círculos llenos) y 10°C (cuadrados vacíos). Los datos muestran dos genotipos realizados durante el *experimento 6* (600 -A:D- y 1579 -E:H-) y 7 (600 -I,J,K,L-) y 8 (600 -M,N,O,P-). Cada punto representa el valor estimado corresponde a la germinación lograda por el 50% de la población de frutos, relativizado al tratamiento que arroja el máximo valor.

15 y 25°C (mostrando la misma tendencia la germinación de embriones). Estos mismos patrones de respuesta a la TA y para los cuatro niveles de CH evaluados, fueron confirmados en el *experimento 8* (Fig. 4.7). En este caso los ensayos incluyeron un tercer tiempo de almacenaje (100 DDA) permitiendo detectar cambios en el nivel de dormición en aquellos tratamientos donde este proceso fue más lento (por ej., CH6% a TA 5 y 25°C; CH 8% a TA 15°C, y CH 10% a TA 5°C). La respuesta de germinación de embriones en ABA (testada a 25°C; *experimento 7*, Fig. 4.6) se correspondió estrechamente con la respuesta de germinación de los aquenios enteros en todo el rango de combinaciones de CH, TA y tiempo de almacenaje. Además, en el *experimento 6*, la capacidad germinativa de embriones en ABA sirvió para discriminar ciertos tratamientos con mayor velocidad de SD, no tan notoria cuando se observaba únicamente el comportamiento de los aquenios.

Para una mejor comparación de los efectos de los tratamientos de almacenaje sobre la SD en los distintos experimentos se calculó la TSDR, expresada en forma relativa al máximo valor alcanzado dentro de cada experimento y para ambas temperaturas de incubación. En la Fig. 4.8 se muestran los valores de TSDR de cada tratamiento de CH y TA (ver dinámicas de SD en la [Fig. S. 4.2](#), [4.3](#), [4.4](#), [4.5](#)). Esto permitió distinguir conjuntos de tratamientos con comportamientos de post-maduración similares en los distintos experimentos. Por un lado, se agruparon aquellos donde la TSDR fue cercana a 0 (o incluso se observó una disminución en la germinación de embriones aislados), almacenados a bajos CH y bajas TA, por ej., CH 4% y TA entre -18° y +15°C, y CH 6% y TA -18°C. Luego, los tratamientos donde el aumento del CH y la TA aumento las TSDR, como 4% de 20-30°C y 6% de 5 a 20°C. A mayores valores de CH y altas TA se produjo una disminución en la TSDR, observado en los tratamientos de CH 8% y TA >15°C y/o CH 10% y TA >5-10°C. Ocasionalmente, en el

genotipo 600 del *experimento 6* se observaron bajo condiciones de altos CH y TA aumentos en las TSDR cuando se incubaron los aqenios a 30°C (no observado a 10°, temperatura de almacenaje donde se magnifica la expresión de la dormición y de pérdidas de vigor).

4.3.3. Capacidad germinativa de embriones en ABA y contenido endógeno de ABA en ejes embrionarios de aqenios almacenados bajo distintas condiciones de CH y TA

La sensibilidad al ABA se visualizó mediante la incubación de embriones en un medio con ABA, y una alta sensibilidad se infiere a partir de la inhibición de la germinación. La germinación de embriones en ABA siguió una dinámica similar a la de los aqenios en los *experimentos 6 y 7* (en ambos genotipos, 600 y 1579). Es así como con un CH de 6% (donde se aceleró la SD de aqenios) se observó una mayor germinación en ABA (menor sensibilidad de embriones al ABA) en TA intermedias (en el genotipo 600: a TA 10-15°C, y en 1579: a TA 15-20°C; Fig. 4.4 y 4.5, paneles F y N). En aqenios con CH 4%, la menor respuesta a ABA se vio a altas TA, opuesto a lo que ocurrió a 8% donde ocurrió a bajas TA (Fig. 4.4, 4.5, 4.6). Además, durante los sucesivos tiempos de muestreos de germinación,

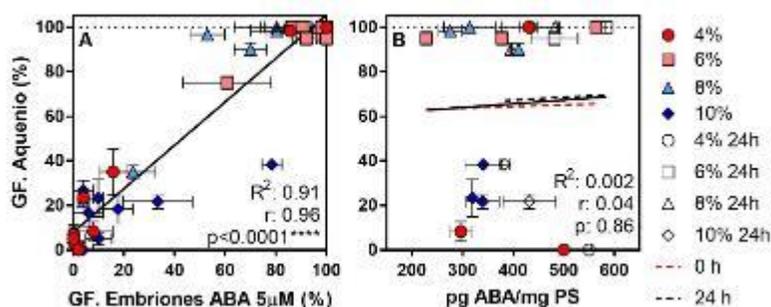


Fig. 4. 190. A) Porcentaje final de germinación (GF) de aqenios incubados en agua destilada en función de la germinación final de embriones aislados incubados en ABA 5 μ M a 25°C, en dos momentos de almacenaje (30 y 70 DAS). B) Porcentaje final de germinación (GF) de aqenios incubados en agua destilada a 25°C en función del contenido de ABA endógeno en ejes embrionarios disecados a los 70 DAS, tanto en aqenios secos (símbolos llenos) e incubados 24h en agua (símbolos vacíos). Cada punto representa la media \pm E.E. del tratamiento combinado de CH (4, 6, 8, 10%) y TA (5, 15, 25°C) de los datos del genotipo 600 en el *experimento 7*. Se muestran el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el valor p.

dicha sensibilidad se fue aliviando a medida que los aquenios disminuían sus niveles de dormición. Esto se pudo observar a través de una regresión lineal, que incluyó todas las combinaciones de CH-TA y tiempos de almacenaje del *experimento 7* (30 y 70 DDA), donde se observó que la germinación de los aquenios en agua aumentó y se asoció positivamente con la capacidad de germinar de los embriones en ABA ($p < 0,0001^{***}$, $r = 0,96$, $R^2 = 0,91$; Fig. 4.9 A). Para evaluar un posible rol de los niveles endógenos de ABA, ya sea a través de cambios durante el almacenaje o en el fruto embebido, se determinaron los niveles de ABA de los ejes embrionarios de los frutos del genotipo 600 almacenados en el *experimento 7*, tanto para aquenios secos e incubados 24 h en agua. No se observó una asociación clara entre los niveles de ABA y la germinación de los diferentes tratamientos de almacenaje (evaluada a los 70 DDA), comparando semillas secas e incubadas durante 24 h en agua ($p = 0,86$, $r = 0,04$, $R^2 = 0,002$; Fig. 4.9 B). Esto sugiere que los cambios en el nivel de dormición durante el almacenaje se deberían principalmente a cambios en la sensibilidad de los embriones al ABA y no a cambios en los niveles endógenos de ABA en el eje embrionario.

4.3.4. Consumo de oxígeno durante el almacenaje

Con el fin de evaluar un posible consumo de oxígeno asociado con el metabolismo aeróbico por parte de los aquenios durante el almacenaje, se midió el contenido de oxígeno (O_2) dentro de los frascos (en ambos genotipos del *experimento 6*) en dos momentos durante el almacenaje (Fig. 4.10). Estas mediciones además permitieron monitorear la efectividad de los tratamientos de anoxia.

La concentración de oxígeno mantuvo el valor inicial (y máximo) en los tratamientos almacenados en freezer (-18°C), indistintamente del CH. Para las TA entre $+5$ y 15°C , los

niveles de oxígeno también se mantuvieron cercanos a los iniciales, y fueron similares entre los tres CH menores (4, 6 y 8%). Para estos mismos CH, durante el almacenaje a TA >15°C los niveles de O₂ disminuyeron levemente (cerca de un 10% a los 70-77 DDA) en ambos genotipos. Por otro lado, también en ambos genotipos, la concentración de O₂ disminuyó fuertemente cuando los aquenios se almacenaron con CH de 10% y TA por encima de 15°C. El consumo acelerado de O₂ para CH 10% a TA mayores a 15°C, sugiere un cambio cualitativo entre estas condiciones de almacenaje (CH10% y TA<15°C) y las demás condiciones evaluadas. Este rápido consumo de O₂ sugiere una reactivación (al menos, en forma parcial) del metabolismo mitocondrial en los aquenios. Debido a que se almacenaron aquenios enteros y sin tratar con fungicida, no se puede descartar el aporte de

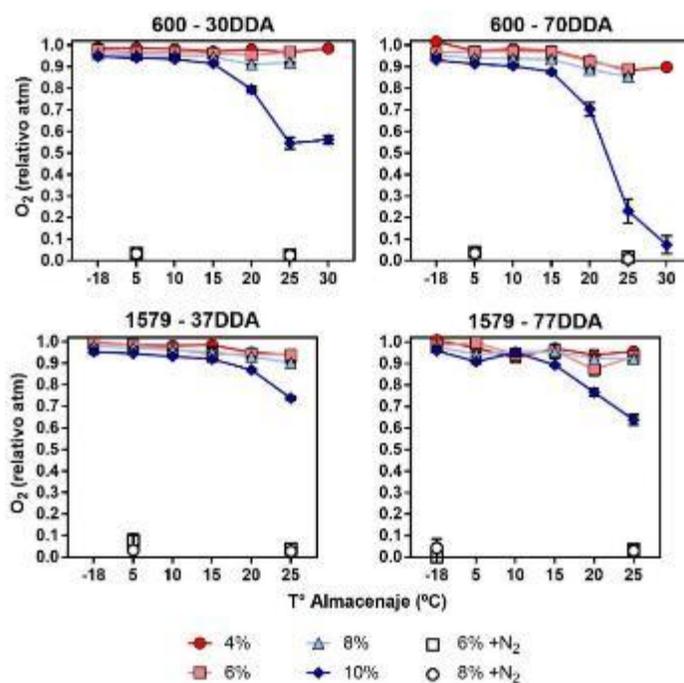


Fig. 4. 217. Mediciones de oxígeno relativo a la atmosfera normal (21%) en función de la TA, para cuatro CH de aquenios (4% -círculos y líneas rojas-, 6% -cuadrados y líneas rosas-, 8% -triángulos y líneas celestes- y 10% -rombos y líneas azules-). Además, se muestran los controles de hipoxia (+N₂) con CH de 6 y 8% (cuadrados y círculos vacíos respectivamente) a 5 y 25°C. Las determinaciones se realizaron en dos genotipos (600 y 1579) del experimento 6, en dos momentos durante el almacenaje (30-37 y 70-77 DDA). Cada punto representa la media ± E.S. (n=3). Las interacciones entre factores resultaron ser estadísticamente significativas (<0,0001***) para ambos tiempos y genotipos.

microorganismo en el pericarpio a esta actividad respiratoria (Domínguez *et al.*, 2019). Sin embargo, se asume que este aporte no fue determinante del consumo de O₂ debido a que no se observó una proliferación de hongos u otros microorganismos durante el almacenaje. Este consumo de O₂ fue de aproximadamente el doble en el genotipo 600 comparado con el 1579. A mayor tiempo de almacenaje (70 y 77 DDA) disminuyeron aún más los niveles de O₂ en estos tratamientos de CH 10% y altas TA, y se acentuó la diferencia entre genotipos (para CH 10% y TA 25°C la caída en la concentración de O₂ fue de 80% para el genotipo 600 y cercana al 30% para 1579).

4.3.5. Evaluación de la SD bajo ausencia de O₂ en el almacenaje (anoxia impuesta por saturación con N₂)

Para evaluar el efecto del ambiente gaseoso sobre la SD, se almacenaron aquenios de ambos genotipos (600 y 1579) en condiciones de anoxia (N₂≈100%) en distintas combinatorias de CH y TA en los *experimentos 6 y 7*. En los tratamientos de anoxia, los niveles de O₂ se mantuvieron cercanos al 0%, asegurando la condición objetivo dentro de los frascos (Fig. 4.10 -símbolos vacíos-).

En cuanto a la respuesta germinativa de los tratamientos de anoxia (con N₂) en general no se observaron diferencias con respecto a los controles cerrados con atmósfera “normal” (Fig. 4.11 y 4.12, en el *experimento 6 y 7* respectivamente). En el *experimento 6*, se combinó el tratamiento de anoxia con los tratamientos de CH de 6 y 8% y TA de 5 y 25°C; en ninguna de estas condiciones la anoxia en almacenaje afectó la posterior germinación de aquenios y de embriones en ambos genotipos, incubados a 10 y 30°C a los 70/77 DDA. En el *experimento 7* se incorporaron los CH de 4 y 10% (también combinados con TA 5 y 25°C),

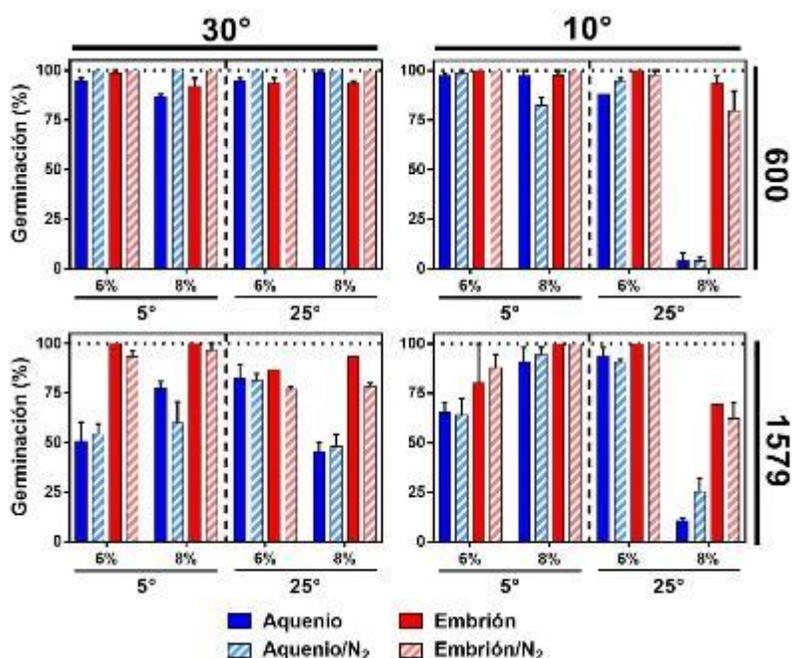


Fig. 4. 244. Porcentaje final de germinación de aquenios y embriones, en aquenios almacenados en normoxia (21% O₂) y anoxia (\approx 100% N₂), con distintos CH (6 y 8%) y TA (5 y 25°C). Se muestran dos temperaturas de incubación (10 y 30°C) en los genotipos 600 y 1579 del *experimento 6*, a los 70 y 77 DDA respectivamente. Cada barra representa la media \pm EE (n=3).

y se determinó la germinación de embriones en ABA; nuevamente, no se observaron diferencias en germinación a los 70 DDA entre los controles con atmósfera normal (21%), y los tratamientos de anoxia cuando éstos se aplicaron en frutos con CH 4, 6 y 8% (Fig. 4.12). Sin embargo, para aquenios con CH 10%, almacenados a 5 y 25°C los tratamientos de anoxia mostraron una mayor germinación (incubación a 25°C) que los respectivos controles. Estas diferencias no se expresaron cuando se incubaron a 10°C, y la sensibilidad de embriones al ABA no se vio afectada por la anoxia. La mayor germinación de aquenios en el tratamiento de anoxia combinada con CH 10% y TA 25°C, admite al menos dos explicaciones: La primera, que la anoxia reduce el deterioro oxidativo que a su vez promueve la pérdida de vigor y menor germinación; la segunda, que las reacciones que conducen a la pérdida de dormición se inhiben en presencia de metabolismo aeróbico. A favor de la primera explicación, no se observó un efecto de la hipoxia en la germinación de los embriones

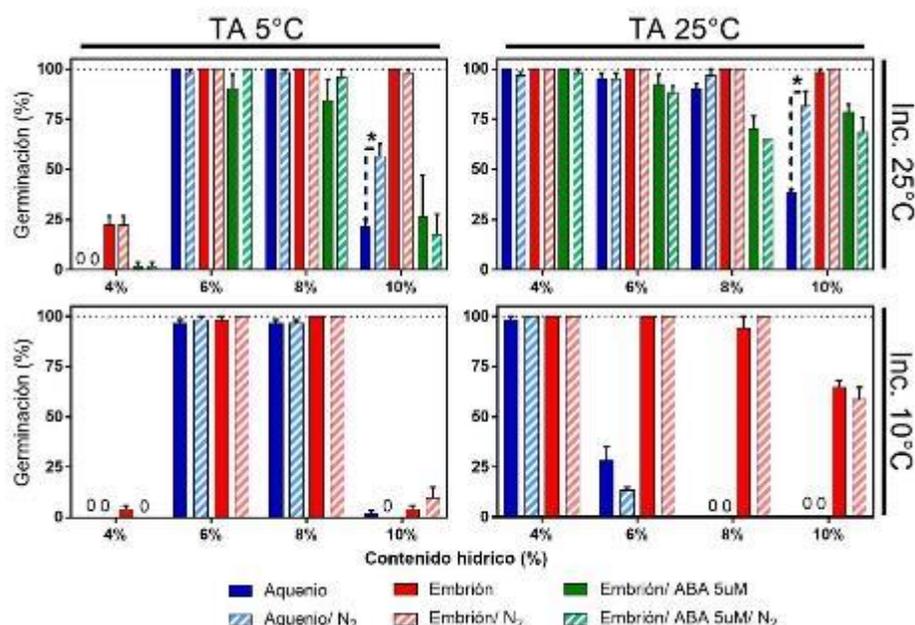


Fig. 4. 271. Poceraje final de germinación de aquenios, embriones en agua destilada y ABA 5µM, donde los aquenios se almacenaron con distintos CH (4, 6, 8 y 10%) y dos TA (5 y 25°C), bajo condiciones de normoxia (21% O₂) y anoxia (100% N₂). Se muestran los resultados luego de 70 DDA bajo dos condiciones de incubación (10 y 25°C). Cada barra representa la media ± EE (n=3). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre control y anoxia.

aislados en agua o en ABA, lo que sugiere que el nivel de dormición embrionaria no se vio afectado.

4.3.6. Indicadores de deterioro en los diferentes tratamientos de almacenaje: evaluación de tratamientos de almacenaje luego de 7 meses

En las distintas condiciones de almacenaje impuestas, pudo haber ocurrido una superposición entre procesos de pérdida de la dormición y deterioro de los aquenios. Aun cuando el avance del deterioro conduzca a la pérdida de viabilidad de la semilla, en las etapas iniciales el deterioro se puede manifestar como un menor vigor -menor velocidad y porcentaje de final de germinación en condiciones subóptimas de incubación-. En estas condiciones, los efectos del deterioro sobre la dinámica de germinación pueden confundirse con dormición (la cual se mide indirectamente, a través de la dinámica de germinación). Para

discernir entre estos procesos, principalmente en las condiciones de altos CH y TA, se realizó una prueba de germinación a los 200 DDA (≈ 7 meses) en el genotipo 600, a 10°C de incubación (condición donde se expresa más fuertemente la dormición, pero también la falta de vigor). Se usaron aquenios remanentes de los tratamientos aplicados en el *experimento 6*. La SD prosiguió en varios de los tratamientos (en los cuales no se había saturado la germinación a 10°C) (Fig. 4.13, barras celestes). Estos tratamientos son los de CH 4% (para TA 20 y 25°C), y los de CH 8% (TA -18 a 15°C). Este aumento progresivo de la germinación a lo largo de 7 meses sugiere que la SD fue el proceso predominante, y que la respuesta negativa a la TA (en el caso de CH 8%) no se debió a un avance del deterioro con pérdida de vigor. Por otro lado, la germinación fue nula en varios tratamientos (CH 4% y TA $<15^{\circ}\text{C}$; CH 6% y TA -18°C ; CH 8% y TA $> 20^{\circ}\text{C}$, y CH 10% y TA $> 5^{\circ}\text{C}$). En los tratamientos donde se observó una germinación final menor al 50%, se incubaron los aquenios remanentes (no germinados luego de 14 días de incubación) en placas con etefón $100\ \mu\text{M}$ y se realizaron recuentos de germinación, relativizando al total de unidades (Fig. 4.13 -barras verdes acumuladas-). En los tratamientos de CH 4%, la máxima germinación se obtuvo para la TA a 25°C , mientras que a 20°C la germinación no superó el 37%. Cuando se transfirieron los aquenios no germinados a etefón, la germinación alcanzó 88%. Esta respuesta al etefón no se produjo en aquenios no germinados almacenados en los tratamientos de CH 4% y TA -18 , 5, 10 y 15°C . En aquenios con CH de 6%, la germinación fue máxima para todo el rango de TA entre 5 y 25°C , excepto en aquenios a TA -18°C donde la germinación se mantuvo inhibida y similar al inicio del almacenaje. La falta de respuesta al etefón de estos aquenios

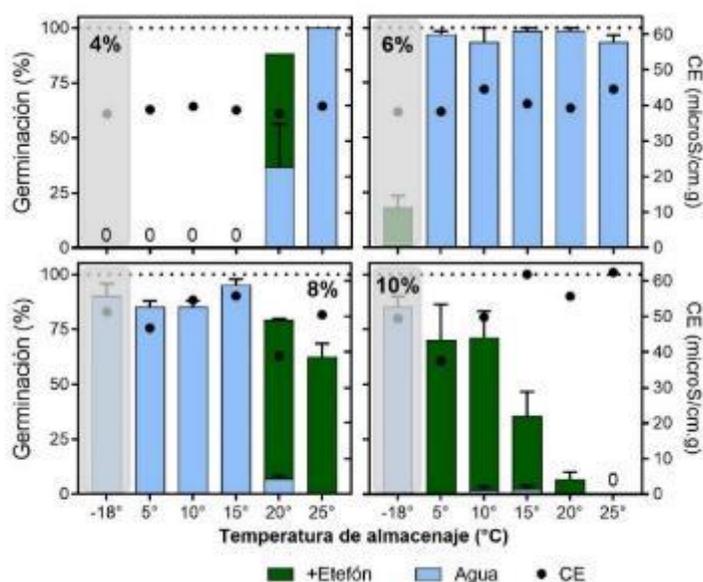


Fig. 4. 298. Porcentaje final de germinación de akenios luego de 200 DDA en el genotipo 600 (*experimento 6*) para los tratamientos de almacenaje incubados en agua destilada a 10°C (E1, barras celestes). Germinación luego transferir akenios remanentes placas con etefón (E2, barras verdes). Los puntos muestran los valores de conductividad eléctrica (CE, en $\mu\text{S}/\text{cm.g}$) a los 70 DDA. Los resultados de ANOVA para CE no arrojaron interacción significativa entre factores, siendo el CH el que tuvo mayor significancia ($p < 0.001^{***}$ vs. TA $p = 0.012^*$).

(CH 6% y -18°C) sugiere una dormición profunda. Cabe destacar que los embriones de los akenios no germinados permanecieron vivos durante todo el período de incubación (determinado visualmente, mediante remoción del pericarpio a los 14 días de incubación, ver tinciones de tetrazolio [Imagen S. 4.1](#)). Para los tratamientos de CH 8%, la germinación superó el 90% para las TA -18 , 5, 10 y 15°C , pero se vio limitada ($<10\%$) para las TA de 20 y 25°C . En estos últimos, la transferencia a etefón permitió alcanzar valores de germinación superiores al 70%. Finalmente, para akenios con CH 10%, la máxima germinación se obtuvo para la TA -18°C , y fue nula para todas las demás TA. En este caso, al transferir los akenios no germinados a etefón, los tratamientos de TA 5 y 10°C superaron el 70%, y esta respuesta decayó para las TA de 15 y 20°C , y fue nula para TA 25°C . Tanto para las TA de 20 y 25°C , además de observarse una baja germinación, los akenios que lograron germinar

presentaron anomalías en las plántulas y otros signos de un deterioro avanzado (p. ej. necrosis, radícula anillada o con estrangulaciones).

Como indicador de diferentes grados de avance del deterioro se llevó a cabo la prueba de conductividad eléctrica (CE) en semillas (previa remoción del pericarpio). En la Fig. 4.13 se presentan los valores de CE medidos en los diferentes tratamientos de CH y TA, pero en una etapa más temprana (70 DDA). Los valores de CE fueron en general menores para frutos con CH 4% y tendieron a aumentar con el CH (aunque también aumentó la variabilidad entre tratamientos contiguos, por ej., CH 8%, TA 15 y 20°C); los mayores valores de CE se obtuvieron en los tratamientos de CH 10% a TA de 15, 20 y 25°C, de acuerdo con el mayor grado de deterioro observado a los 7 meses en estos aquenios. Esta prueba de CE refleja la integridad de la cubierta seminal, pudiendo potencialmente su selectividad depender del estado de la cutícula y/o de las membranas de las células endospermáticas.

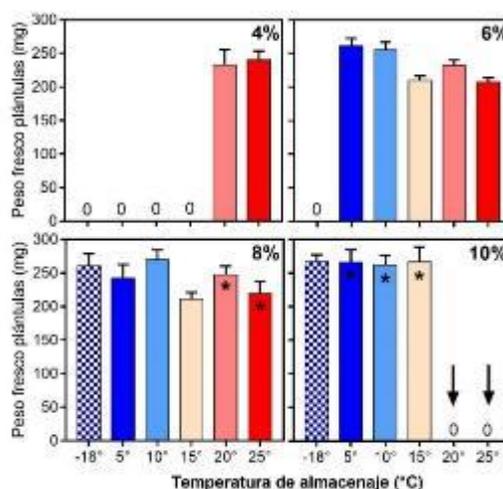


Fig. 4. 325. Peso fresco de plántulas (mg) en función de la TA (°C) en los 4 CH evaluados (representados en los recuadros) a los 200 DDA. Los asteriscos representan tratamientos que fueron transferidos a etefón (E2, luego de haber incubado en agua destilada-E1-) a 10°C, y las flechas representan aquellos con falta de germinación (o presencia de plántulas anormales). Las barras representan la media \pm su EE.

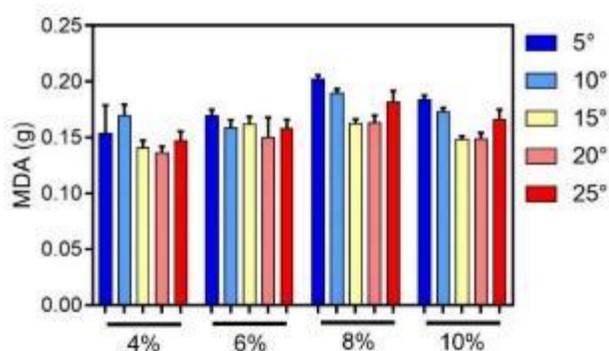


Fig. 4. 351. Niveles de malondialdehído (mg MDA/ g ejes embrionarios) para tratamientos bajos distintos CH (4, 6, 8 y 10%) y TA (5-25°C) determinados a los 70 DDA en el genotipo 600 del *experimento 7*. Cada barra representa la media \pm E.E. (n=3). Los resultados de ANOVA no arrojaron interacción significativa entre factores, siendo los efectos de ambos factores (CH y TA) significativos ($p < 0.001$ ***).

Otra forma de determinar el nivel de deterioro ocurrido bajo las distintas condiciones de almacenaje fue mediante la prueba de TBARS, y la cuantificación por colorimetría del producto malondialdehído (MDA). Este método determina el nivel de deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados que conforman las membranas celulares. A diferencia de la prueba de CE realizada con semillas enteras, la prueba de TBARS se realizó con ejes embrionarios (con su porción de endosperma micropilar adherida). Se muestran los datos obtenidos con muestras de 70 DDA del genotipo 600 del *experimento 7* (Fig. 4.15). Los niveles de MDA mostraron una respuesta bimodal a la TA, con valores mayores a TA 5 y 25°C, y un mínimo a 15°C, y esto se repitió para los cuatro niveles de CH (la interacción entre CH y TA no fue significativa). El CH no tuvo un efecto lineal sobre los niveles de MDA, con valores algo mayores a CH 8%. No se pudieron asociar estas variaciones con los cambios producidos en la respuesta germinativa dentro de todo el conjunto de datos. A diferencia de lo observado para los datos de CE en este mismo experimento, no presentaron un patrón creciente con el CH y la TA. Los resultados de ANOVA no mostraron interacción de estos dos factores, siendo significativo el efecto de ambos factores (CH y TA, ver leyenda

de la Fig. 4.15). Los CH de 8% mostraron los mayores valores vs. 4, 6, 10% y TA de 20^a, 15^{ab}, 25^{ab}, 5^{ab} y 10°C^b. Por lo tanto, no se encontró una asociación clara entre los valores de MDA y la dormición o el deterioro.

Como indicador de vigor se evaluó también el peso fresco de las plántulas obtenidas de los aquenios previamente germinados en agua o en etefón (para el caso de aquenios que no habían germinado primero en agua). Los aquenios recién germinados (radícula emergida), se incubaron en un cuarto de cultivo con luz durante 4 d para observar el desarrollo de las plántulas (normales o anormales) y determinar su PF (Fig. 4.14). El PF de plántulas resultó ser similar para todos los tratamientos que germinaron tanto en agua como en etefón, y no se observaron diferencias en la morfología de las plántulas que sugieran algún deterioro en estos tratamientos.

4.3.7. Ensayos de reversión del CH durante el almacenaje

El objetivo de estos ensayos fue evaluar si la tasa de SD responde de manera dinámica al CH (esto es, si variaciones en el CH producen cambios en la tasa de SD, ya sea de menor a mayor o viceversa). Alternativamente, se contempló la posibilidad de que un aumento en el CH (a 10%) no solo inhiba, sino que además revierta a un mayor nivel la dormición de aquenios que previamente post-maduración con CH 6% y perdieron parcialmente la dormición (causando una inducción en dormición secundaria). Estos resultados aportarían a entender el tipo de reacciones que conducen a los cambios en la dormición, así como a separar mejor la influencia de los procesos de salida de dormición y deterioro sobre la respuesta germinativa. Al inicio del experimento, se almacenaron aquenios con distintos niveles de CH (6, 8 y 10%) a una única TA de 20°C. Avanzado el almacenaje (39 DDA; momento donde fue posible observar las diferencias reportadas en los experimentos anteriores), se iniciaron los siguientes

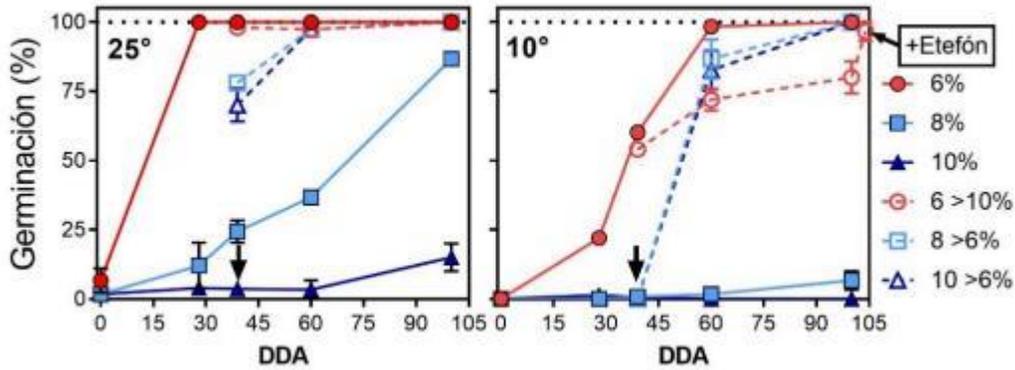


Fig. 4.372. Porcentaje final de germinación de aquenios incubados 10 y 25°C, almacenados a 20°C con distintos CH constantes (6, 8 y 10%). Las determinaciones se realizaron en distintos momentos comenzado el almacenaje (DDA). Avanzado el almacenaje (39 DDA), se muestran los tratamientos de reversión en los CH (6 a 10%, 8 a 6% y 10 a 6%), y su correspondiente porcentaje de germinación luego del cambio en el CH (39 DDA, indicado con flecha negra) y luego de un periodo de almacenaje (60 y 100 DDA).

tratamientos de “reversión” del CH: aquenios con CH 6% se humedecieron a 10%; y aquenios almacenados con CH 8% y 10% se secaron hasta llegar a CH 6%. Se evaluó la germinación de los aquenios a 25 y a 10°C de incubación (Fig. 4.16).

Acorde a lo observado en experimentos previos, la SD fue afectada por el CH. A los 28 DDA el tratamiento de CH 6% alcanzó un 100% de germinación a 25°C de incubación, mientras que los tratamientos de 8% y 10% germinaron muy poco (12% y 4%, respectivamente). Posteriormente, en aquellos tratamientos donde se disminuyó el CH de 8 y 10% hasta un CH de 6%, el proceso de secado tuvo un efecto inmediato sobre la germinación, la cual aumentó con respecto a los controles (para CH de 8%, aumentó de 24% a 78% y al secarse a 6%; y para

CH 10%, aumentó de 4% a 40%). Sin embargo, cuando se evaluaron incubando a 10°C (donde expresa en mayor medida la dormición que a 25°C), el secado a CH 6% no produjo cambios inmediatos en la germinación, pero sí se aceleró la tasa de SD durante el almacenaje posterior. Esto se observó a los 60 DDA (21 días luego del secado) a 10°C de incubación como un aumento marcado en la germinación (>80%) en los tratamientos CH 8→6%, y CH

10→6% con respecto a los tratamientos que prosiguieron el almacenaje con CH 8 y 10% (estos no superaron el 10%, aun a los 100 DDA, 61 días después del secado).

Para el tratamiento inverso, donde el CH se aumentó de 6 a 10% (CH 6→10%), se observó un retraso significativo de la SD con respecto a los aquenios que se mantuvieron siempre con CH 6%; esto se observó principalmente a 10°C de incubación. Estos no lograron superar el 80% de germinación aún a los 100 DDA (61 DDA luego del humedecimiento), donde la transferencia a etefón permitió alcanzar el 100%). A 25°C de incubación, se observó que no se modificó la germinación alcanzada previo al humedecimiento (se mantuvo cercano al 100%), por lo cual no hubo una inducción en dormición secundaria, o una pérdida de vigor detectable en la respuesta germinativa.

Para evaluar si los frutos almacenados con CH 4% y baja TA que no llegaron a germinar aún después de tiempos de almacenaje prolongados aun eran capaces de post-madurar, se realizó un nuevo ensayo. Este se llevó a cabo con aquenios previamente almacenados con CH de 4% a TA 10° y 15°C (condiciones que impiden la SD) durante 16 meses; para una submuestra se modificó el CH de 4 a 6% (CH 4 → 6%) y se siguió el almacenaje a las mismas TA (10 y 15°C). Luego de 40 DDA de modificar los CH se evaluó la germinación a 10 y 25°C de incubación (Cuadro 4.1). Para las muestras que se mantuvieron con CH 4% se obtuvo una germinación nula ($\approx 0\%$) mientras que las muestras que se humedecieron a 6% pudieron germinar al 100%. Esto indica que en frutos con CH de 4% y almacenados a bajas temperaturas ($<15^\circ\text{C}$) se reprime la SD sin afectar el vigor; la SD puede promoverse al aumentar el CH (o posiblemente, la temperatura, $\text{TA}>20^\circ\text{C}$).

Estos resultados indican que aquenios almacenados en condiciones que resultan inhibitorias para la SD (p.ej., CH elevados $\approx 8-10\%$ y TA 20°C , o bajo CH 4% y TA $< 15^\circ\text{C}$), son aún capaces de perder la dormición con una alta tasa si son secados o humedecidos a niveles de CH óptimos para la ocurrencia de este proceso (CH $\approx 6\%$). Para las condiciones de altos CH, esto sería posible dentro de cierto rango temporal ya que en estas condiciones también avanza el proceso de deterioro. La SD se trata por lo tanto de un proceso gradual, cuya velocidad puede modularse según las condiciones del CH y TA. Esto además funciona en manera inversa, a partir de cambios en los CH desde condiciones que promueven una mayor velocidad de SD (CH $\approx 6\%$, a 20°C) hacia CH donde dicha SD se retrasa (CH $\approx 8-10\%$, a 20°C). Los cambios inmediatos generados por el “secado” a un CH 6% fueron semejantes a los observados al inicio de los *experimentos 6, 7 y 8*. Esto indica que aun cuando el inicio de la post-maduración ocurra con una CH y una TA donde la SD se ve demorada, ésta puede acelerarse si se procede a secar los aquenios a CH 6% . Bajo estas condiciones, también es mayor el rango de TA que posibilitan la SD en comparación con los CH 8 y 10% (donde solo bajas TA lo permiten). Para condiciones de bajos CH, es diferente, ya que se puede promover

Cuadro 4. 20. Efecto de los cambios del CH (%) luego de un almacenaje prologado (16 meses) a 10 y 15°C . Se muestra la germinación de aquenios a dos temperaturas de incubación (10 , 25°C), almacenados a CH de 4% constantes durante 16 meses y luego, sobre una submuestra se modificó el CH de 4 a 6% (almacenado durante 40 días). Cada valor indica la media \pm EE ($n=3$).

TA ($^\circ\text{C}$)	CH (%)	T $^\circ$ Incubación ($^\circ\text{C}$)	Germinación (%)
10	4	10	0 ± 0
		25	0 ± 0
	4 \rightarrow 6	10	97 ± 3
		25	100 ± 0
15	4	10	0 ± 0
		25	0 ± 0
	4 \rightarrow 6	10	100 ± 0
		25	100 ± 0

la SD incluso luego de un almacenaje prologado (16 meses) sin afectarse el vigor de los aquenios. Los resultados de este experimento indican que la SD (al menos dentro del rango de condiciones explorado) ocurre en forma unidireccional, y que el CH actúa modulando la velocidad de SD primaria. No se observaron evidencias de inducción de dormición secundaria. Además, parecería que tanto la SD como el deterioro responden diferencialmente a las condiciones ambientales de almacenaje que las favorecen, sugiriendo que podrían desencadenarse por mecanismos bioquímicos disímiles.

4.3.8. Desarrollo de un modelo para la tasa de SD de los aquenios en función de la humedad relativa de equilibrio y/o potencial agua de almacenaje. Relación con los modelos de deterioro de Ellis y Roberts

La tasa de SD relativa (TSDR) calculadas en los *experimentos* 6, 7 y 8 (Fig. 4.8) reflejaron la velocidad de salida de los aquenios para la combinatoria de tratamientos de CH y TA. Además, la obtención de las isotermas de sorción permitió obtener la HRe de cada tratamiento (Fig. 4.17 A, [S. 4.6](#) A, B). Además, se pudo calcular el potencial agua de los aquenios (ψ_w). Ambas variables permiten reflejar su estado termodinámico y la posibilidad de reacciones químicas. En conjunto, se calculó la tasa de deterioro relativo (TDR) a través de la función de viabilidad de Ellis y Roberts (1980) para poder discernir conceptualmente entre los procesos de pérdida de dormición y deterioro. Se visualizaron los valores de TSDR y TDR del genotipo 600 en el *experimento* 8 en función de la HRe y del ψ_w de los aquenios (Fig. 4.17 B, [S. 4.6](#) D para HRe y ψ_w respectivamente). Visualmente, se pudieron diferenciar 4 zonas con distintos comportamientos. La primera (denominada “A”), a valores muy bajos de HRe (<38%) y ψ_w (-200 a -130 MPa), se destacó por la ausencia de pérdida de dormición y viabilidad de las semillas (según la función de Ellis y Roberts, 1980). En esta zona se

ubicaron los tratamientos de bajos CH (4%) y TA entre -18 a 15°C , sumado al tratamiento de 6% a -18°C . En la zona “B”, de HRe entre 38 - 65% y ψ_w intermedios (-130 a -60 MPa), la TSDR aumentó, maximizándose alrededor de los -70 MPa y 60% . Los tratamientos comprendidos en esta zona fueron los de CH de 4% y TA cálidas (20 - 25°C), CH 6% combinado con TA entre 5 y 20°C (asociados a aumentos del CH y las TA) y CH de 8% a -18°C . En la zona “C”, que se ubicó en HRe entre 65 - 85% y ψ_w desde -60 a -20 MPa, se observó una marcada caída de las TSDR con el aumento de la HRe/ ψ_w de los aquenios. En esta zona se ubicaron los tratamientos de CH 6% a 25°C y aquellos de mayores CH y bajas

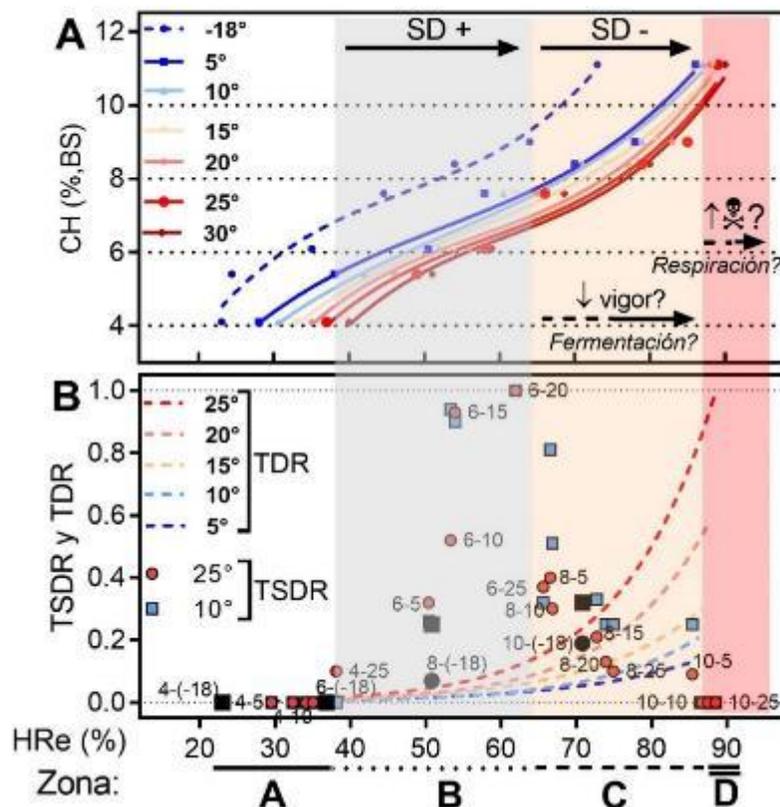


Fig. 4. 392. Modelo de TSDR y la TDR para la combinatoria de tratamientos de CH y TA en el genotipo 600 del *experimento 8*, en función de la HRe (% , panel A) y ψ_w (MPa, panel B). Cada punto de TSDR representa el valor estimado a partir de los modelos de salida de la Fig. S 4.6. para 10° (cuadrados azules) y 25°C de incubación (círculos rojos). Los puntos negros indican los tratamientos de -18°C . Se muestra sobre algunos puntos una leyenda indicando la combinatoria de tratamientos (CH-TA). Las funciones exponenciales de TDR se muestran en líneas punteadas para cada TA (5 , 10 , 15 , 20 y 25°C).

TA (8%, 5-25°C; 10%, -18, 5°C). En dicha zona, las mayores TA combinadas con altos CH (8 y 10%) tienen un efecto negativo en la TSDR. Sobre el límite inferior (-60 MPa y 65%) de esta región, se observa un aumento de las TDR (“teóricas”) en las condiciones de TA más cálidas (20-25°C). Finalmente, la zona “D” se caracterizó por tener tasas de SD bajas a nulas con respecto a la zona “C” y avances aún mayores de la pérdida de viabilidad. Las condiciones que favorecieron la TSDR fueron de altas CH (10%) y bajas TA (condición donde el deterioro fue menos evidente). Por otro lado, las condiciones de mayores TA (20-25°C) fueron las que coincidieron con las mayores TDR.

4.4. Discusión

Entre los girasoles cultivados es común encontrar niveles de dormición al momento de cosecha que impiden su germinación. Generalmente la dormición primaria se disipa luego de un periodo de almacenaje en seco, aunque este puede variar desde unas pocas semanas hasta más de un año. De acuerdo con trabajos previos, el nivel de dormición al momento de cosecha y su dinámica posterior dependen del genotipo (capítulo 2 de esta tesis; Arata *et al.*, 2021), del ambiente materno (Riveira-Rubin *et al.*, 2021) y de las condiciones de almacenaje de los frutos (Rodríguez *et al.*, 2018; Bazin *et al.*, 2011^a). Aunque existe consenso sobre la importancia del CH y de la TA de los frutos/semillas sobre la post-maduración en girasol (Bazin *et al.*, 2011^{a, b}; Leopold *et al.*, 1988; Meimoun *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2017) y en muchas otras especies, el efecto de estos factores y sus posibles interacciones no habían sido debidamente estudiados en girasol. En particular, se reconoció una brecha en el conocimiento necesario para diseñar estrategias de manejo en postcosecha en la industria de semilla híbrida y reducir las fuentes de variabilidad (aún muy grandes) para el nivel de

dormición, incluso entre lotes de un mismo genotipo. Una posible fuente de variación podría resultar de diferencias en las prácticas de acondicionamiento de la “semilla” y su manejo en postcosecha. En consecuencia, se plantó la necesidad de aclarar el rol que tienen el CH y la TA sobre la salida de dormición (SD) en aquenios de girasol, bajo condiciones conformes a las exploradas en la industria semillera. De acuerdo con trabajos previos en girasol (Bazin *et al.*, 2011^a) y en otras especies como *Xanthium sp.*, *Avena fatua*, *Heterocogun contortus*, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (Esashi *et al.*, 1993; Foley, 1994; Bazin *et al.*, 2011^{a,b}; Baldos *et al.*, 2014; Basbouss-Serhal *et al.*, 2016; Leopold *et al.*, 1988), cabía esperar interacciones entre estos dos factores. Sin embargo, los patrones que siguieron dichas interacciones difirieron entre especies, incluso para girasol (Bazin *et al.*, 2011^a). Los resultados obtenidos en este capítulo arrojan una fuerte interacción entre el CH y TA sobre la tasa de SD (Fig. 4.4, 4.5, 4.6, 4.7). Las condiciones que optimizaron la SD se obtuvieron con CH de 6% y TA entre 10 y 20°C (Fig. 4.8). A menor CH (4%), la SD fue promovida por TA cálidas (>20°C) e inhibida por TA bajas (<15°C). A mayores niveles de CH (8 y 10%), la SD se promovió principalmente a bajas TA, disminuyendo hacia TA más cálidas. Un patrón similar se había observado en *Avena fatua* y *Xanthium sp.* (Foley, 1994; Esashi *et al.*, 1993). Por otro lado, trabajos previos en girasol y *Arabidopsis* mostraron un patrón inverso, donde a medida que aumentó el CH, la SD se promovió por TA más altas (Bazin *et al.*, 2011^a; Basbouss-Serhal *et al.*, 2016). Lo destacable fue que, para muchas de estas especies (independientemente del patrón observado) las condiciones óptimas de CH y TA que promovieron la SD coincidieron con valores de HR cercanos al 55-60% (Basbouss-Serhal *et al.*, 2016; Esashi *et al.*, 1993; Foley, 1994; Rodríguez *et al.*, 2017). Este valor de HR (o a_w) puede resultar de diferentes combinaciones de CH y TA, y se puede asociar con un estado

termodinámico del agua (mediante el ψ_w) que optimiza las reacciones implicadas en la SD. El uso de estas variables (HR/a_w y el ψ_w) fue propuesto por Vertucci y Roos (1990, 1993) para explicar la probabilidad de reacciones químicas en medio acuoso en relación con el proceso de deterioro de las semillas, y optimizar las condiciones de almacenaje en los bancos de germoplasma. Este marco conceptual aplicado al estudio de la post-maduración en seco en semillas ortodoxas muestra que la SD se ve favorecida con HR intermedias en torno al 55-60%, disminuyendo la tasa de SD hacia HR bajas y también altas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

A partir del análisis conjunto de los resultados de los experimentos de almacenaje presentados en este capítulo (basados en la combinatoria de niveles de CH y TA) se propuso un modelo que asocia la TSDR con la HR del aire en equilibrio con las muestras. Este modelo permitió delimitar cuatro zonas de HR o ψ_w que reflejan cambios cualitativos en la SD (Fig. 4.17 B, [S. 4.6 D](#)). En la primera zona de bajas HR/ ψ_w (< 38% y -130MPa) la SD de aquenios y embriones fue nula. En esta zona “A”, los procesos que conducen a la SD estarían inhibidos, y la dormición embrionaria se mantiene sin cambios aparentes. Debido a que se observó una disminución de la germinación durante el almacenaje en estas condiciones de baja HR (con respecto a la condición previa a la imposición de los tratamientos de TA, 0 DDA; Fig. 4.4, 4.5; 4.6), se planteó la posibilidad de una pérdida de vigor asociada con estas condiciones de almacenaje. Según otros trabajos enfocados en optimizar las condiciones de almacenaje para la conservación de semillas, aun en este rango de CH muy bajas podrían ocurrir reacciones de deterioro. Por ej., Vertucci y Roos (1993) observaron un efecto negativo sobre la longevidad de las semillas de varias especies cuando éstas son almacenadas a valores muy bajos de ψ_w . Sin embargo, la pérdida de vigor en estos tratamientos se desestimó luego de

los ensayos de reversión del CH, donde tratamientos almacenados con CH de 4% y TA a 10 y 15° durante 16 meses y que luego fueron humedecidos hasta 6%, permitieron que se promueva la SD sin signos de deterioro (Cuadro 4.1). Esto sugiere que en esta zona de HR/ ψ_w se detiene el proceso de SD, sin afectarse el vigor de los aquenios (aún luego de almacenajes prolongados). Es posible entonces que la menor germinación observada con respecto al valor inicial se deba a una profundización de la dormición primaria por el secado excesivo. La inhibición de la SD con bajas HR también se observó en otras especies como *Xanthium sp.*, arroz y avena. Los tratamientos de esta zona de respuesta se ubicaron próximos a la región 1 de las isothermas de sorción (Fig. 4.17 A) donde el agua está fuertemente unida a las macromoléculas y la movilidad molecular es extremadamente baja, limitando las reacciones bioquímicas (Leopold *et al.*, 1988; Esashi *et al.*, 1993). Sin embargo, aun a muy bajos niveles de hidratación algunas reacciones pueden continuar muy lentamente, como la oxidación lipídica (Labouza, 1980) e incluso reacciones de enzimas catalíticas que ocurren en medios no acuosos (p. ej. lipasas, fosfolipasas; Drapron, 1985; Camacho Páez *et al.*, 2003). Las reacciones asociadas con el deterioro ocurrirían a una velocidad muy baja y no llegaron a tener consecuencias detectables dentro del periodo evaluado (hasta 16 meses).

La zona “B” del modelo (Fig. 4.17 B; ψ_w entre -130 y -60 MPa o HR entre 38-65%), se caracterizó por un aumento progresivo de la tasa de SD de aquenios y embriones hacia mayores valores de HR (o ψ_w) hasta un valor máximo alrededor de HR de 60%. Los tratamientos de CHxTA abarcados en esta zona de HR/ ψ_w se encuentran dentro de la región 2 de las isothermas de sorción (Fig. 4.17 A). Aquí, el agua se asocia débilmente con las superficies macromoleculares (con una disminución drástica de la entalpia) y comienza a tener propiedades de solvente pudiendo permitir la actividad de ciertas enzimas hidrosolubles

(Leopold y Vertucci, 1989). La posibilidad de reacciones químicas (tanto de origen enzimático como no-enzimático) dentro de este rango de valores de HR se apoya en trabajos donde se midió la emisión de compuestos orgánicos volátiles (Zhang *et al.*, 1995; Mira *et al.*, 2010). Mira *et al.* (2016), observaron que semillas de lechuga almacenadas con HR 33-40% a 35°C emitieron compuestos que reflejan la ocurrencia de reacciones de peroxidación, y una muy baja emisión de alcoholes que serían producto de la fermentación. Teniendo en cuenta estos antecedentes en lechuga, y la ausencia de consumo de oxígeno en las muestras dentro de esta zona “B” (Fig. 4.10), se plantea la posibilidad de que las reacciones que desencadenen la SD dentro de esta región ocurren en ausencia de metabolismo. Las reacciones químicas de oxidación o peroxidación pueden producirse en ausencia o presencia de catálisis enzimática (Mira *et al.*, 2010), y varios autores (Oracz *et al.*, 2007; Bailly *et al.*, 2008; Bazin *et al.*, 2011) han propuesto que las ROS resultantes de estas reacciones tienen un rol principal en promover la SD. En cuanto a la participación de reacciones oxidativas auto-catalíticas en la SD en la zona “B”, no se observó una asociación clara entre los niveles de MDA y la tasa de SD que apoyen esta posibilidad. De hecho, los tratamientos comprendidos en esta región presentaron un bajo deterioro oxidativo reflejado tanto en los valores de MDA como de CE (Fig. 4.13, 4.15).

En la zona “C” del modelo (Fig. 4.17; ψ_w entre -60/-20 MPa o HR entre 65 y 85%), la tasa de SD disminuyó progresivamente con el aumento de la HR. A diferencia de la dormición profunda observada en la zona “A” (donde se mantuvo la dormición de los embriones), los niveles de dormición en esta zona (“C”) fueron intermedios, y la restricción a la germinación -impuesta principalmente por las cubiertas- fue revertida por etefón (Fig. 4.13) o por la remoción de las cubiertas ([Imagen S. 4.1 A](#)). La transición entre las zonas “B” y “C” parece

coincidir con el límite de actividad biológica determinado por Walters *et al.* (2002) en torno a HR 70% (-50 MPa). En relación con las isotermas de sorción, la zona “C” se ubica en el extremo de la región 2 y el comienzo de la región 3 (Fig. S. 4.6 B), donde las superficies de las macromoléculas se encuentran totalmente humedecidas y hay agua libre. La ausencia de consumo de O₂ en los tratamientos de esta zona (CH 8% y 10% a TA < 15°C; Fig. 4.10), indica la ausencia de respiración mitocondrial, pero es posible que haya actividad de glucólisis y metabolismo de tipo fermentativo. Apoyan esta posibilidad trabajos realizados por Mira *et al.* (2010; 2016) donde se observaron la emisión de alcoholes (etanol y metanol) por parte de semillas equilibradas con una HR del 70% y a una TA 35°C. Además, dentro de la zona “C”, de acuerdo con el modelo de deterioro de Ellis y Roberts, comienza a promoverse el deterioro, el cual se acentúa con mayores TA (p. ej. TDR ≈ 0,2 con CH de 8% y 25°C). Este deterioro sin embargo puede ser asintomático dentro de los plazos temporales evaluados, aunque podría disminuir el vigor germinativo afectando solo la germinación en condiciones subóptimas, por ej., incubando a 10°C. Sin embargo, a esta temperatura también se manifestó en mayor medida la dormición primaria (o DEBT) y es difícil distinguir el aporte simultáneo de ambos procesos (SD y deterioro) a partir de la interpretación de los datos de germinación. Los datos de MDA, CE y vigor mediante PF de plántulas no evidenciaron un deterioro en estas condiciones de almacenaje.

En la zona “D” del modelo se ubicaron los tratamientos con valores de HR / ψ_w más elevados (Fig. 4.17; > 85% y > -20 MPa) y para los cuales se observó una baja o nula TSDR. En los tratamientos más extremos (CH 10% y TA 20-25°C) fue evidente el avance del deterioro. En estas condiciones se observó un bajo vigor y una pérdida de viabilidad luego de varios meses de almacenaje (a través de una germinación anormal o nula al transferir a etefón (Fig. 4.13,

4.14). El modelado de la TDR para estas condiciones de almacenaje también mostró un aumento exponencial con la HR en esta zona. Por otro lado, la SD en las TA entre 5 y 15°C ocurrió parcialmente y aliviando la dormición de embriones los incubados a 25°C (Fig. 4.6; 4.12) y en la promoción de la germinación de los aquenios con etefón (Fig. 4.13). En estos tratamientos de CH 10% y TA 5-15°C, la muy baja germinación de frutos pudo deberse a una dormición embrionaria residual, sumado a un bajo vigor de los embriones llevando a la incapacidad de los embriones de superar la restricción impuesta por las cubiertas. Esto sostiene la idea de que en esta zona de altas HR/ ψ_w se afectaría la velocidad de SD, con cierta superposición del avance del deterioro (principalmente a altos CH y TA). El consumo de O₂ en frutos con CH de 10% y TA >15°C (Fig. 3.10) permite inferir una reactivación del metabolismo aeróbico. Esta zona de ψ_w se aproxima a las condiciones de “desbalance metabólico” definido por Bewley *et al.* (2013), donde las condiciones de almacenaje (HR 75-100% y TA cálidas) aceleran la producción ROS desencadenando el deterioro oxidativo de los aquenios. Es importante destacar que en esta zona podría actuar un mecanismo alternativo de SD mediado por la producción de ROS de origen metabólico, tal como observaron Bazin *et al.* (2011^a). Este mecanismo explicaría los resultados del experimento 6 (genotipo 600), donde altos CH (10%) y altas TA (>15°C) promovieron la SD que se reflejó en altos valores de germinación a 30°C de incubación (no observado a 10°C, donde se expresa en mayor medida la dormición y el avance del deterioro; Fig. 4.4, 4.8.D). La rápida SD en el experimento 6 (600) con CH 10% y TA>15°C pudo haberse debido al método empleado en lograr el valor de CH 10%, el cual fue por adsorción (humedecimiento) de los frutos previamente secados a CH 6% (a diferencia de los otros experimentos donde se lograron los CH objetivo mediante desorción). Estos resultados concuerdan con la promoción de la SD

por altas TA observada y modelada por Bazin et al. (2011^a), correspondiente a muestras con CH 10% y altas TA. Bailly *et al.* (2008) propusieron el concepto de "ventana oxidativa de germinación", que restringe la ocurrencia de los eventos celulares asociados a la SD promoviendo la germinación a un rango de niveles de ROS, delimitado por límites inferiores y superiores. De acuerdo con Bewley *et al.* (2013) el "desbalance metabólico" en estas condiciones se debe a una reactivación parcial del metabolismo mitocondrial y la producción de ROS que supera la contención de los mecanismos antioxidantes. Estas ROS cumplen una función dual promoviendo la SD (Vigliocco *et al.*, 2020) y a la vez causando un daño oxidativo y pérdida de vigor de manera acelerada (Bailly *et al.*, 2019). Por lo tanto, la prevalencia de un proceso sobre el otro dependería de los niveles iniciales de dormición, la viabilidad potencial del fruto y de la tasa de producción de ROS, dando lugar a diferentes patrones temporales de germinación.

Como se pudo observar en las zonas "C" y "D" de mayores HR/ψ_w , variaciones importantes en la intensidad de los procesos de SD y deterioro ocurren con pequeños cambios en las condiciones de CH y TA o HR/ψ_w . Mediante ensayos de transferencia (o reversión) entre diferentes niveles de CH durante el almacenaje, se determinó que el proceso de SD primaria es, en general, unidireccional y su dinámica varía de manera reversible con cambios en el CH o HR/ψ_w (Fig. 4.16). El secado de frutos a un CH 6% (transferencia a la zona "B") luego de un periodo de almacenaje con alto CH (8 y 10%; zonas "C" y "D") promovió un aumento de la velocidad de SD; algo similar ocurrió al transferir muestras desde la zona "A" (CH de 4% y TA 10 y 15°C) donde se mantuvo la dormición profunda, hacia la zona "B" (con CH de 6%) donde se completó la SD en pocas semanas. Por otro lado, la transferencia de muestras desde la zona "B" a la "D" por humedecimiento (6→10%) provocó un retraso en la SD (sin

pérdida de viabilidad). En su conjunto, estos resultados sugieren que la SD y el deterioro no están necesariamente acoplados (aunque se superpone temporalmente), sino que responden a mecanismos diferentes cuya velocidad puede modularse de manera independiente.

En la Fig. 4.17 se resume en forma esquemática el modelo de respuesta de la tasa de SD (o TSDR) en función de la HR, indicando las cuatro zonas de respuesta y su relación con el metabolismo primario. La SD está favorecida por valores de HR/ψ_w crecientes dentro de la zona “B”, esto es, por encima de un umbral del 38% y con un óptimo alrededor del 60%. Dentro de este rango se asume que no hay metabolismo fermentativo ni aeróbico. Por encima de HR 65%, la tasa de SD disminuye hacia niveles de HR crecientes, y que coinciden con la reactivación gradual del metabolismo (glicólisis/vía fermentativa a lo largo de la zona “C”). En la zona “D”, con $HR > 80\%$, comienza a activarse la respiración mitocondrial y al mismo tiempo se inhibe la vía fermentativa (Bewley *et al.*, 2013). Es en esta última zona de HR alta donde los procesos de deterioro y la SD podrían estar controlados de manera simultánea por las ROS. Como se dijo anteriormente, trabajos previos han intentado explicar el mecanismo de SD mediante la ocurrencia de reacciones oxidativas mediadas por ROS (Oracz *et al.*, 2007; Bailly *et al.*, 2008; Morsher *et al.*, 2015; Buijs *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos no apoyan una asociación positiva entre la SD observada en la zona “B” y el deterioro oxidativo (evaluado mediante test de CE y MDA; Fig. 4.13, 4.15, [S. 4.7](#)), aunque las ROS producidas podrían tener un rol como “señal” en la SD y aun así estar debajo del umbral de detección de los métodos empleados y no asociarse con el deterioro oxidativo.

En cuanto al rol del oxígeno como promotor de la SD en las zonas “A-B-C” del modelo, la SD no se vio afectada por la anoxia (Fig. 4.12, 4.13). Estos resultados coinciden con lo reportado en *Xanthium sp.* y *Arabidopsis* (Esashi *et al.*, 1993; Buijs *et al.*, 2018). A favor de

una posible producción de ROS en anoxia, Esashi *et al.* (2003) proponen que la fuente de ROS de origen no-enzimáticas podrían deberse a reacciones de Amadori-Maillard, que no requieren de la presencia de oxígeno (Ellis, 1959), condición que si es necesaria para que ocurra la peroxidación de lípidos. Por otro lado, el almacenaje de frutos con alto CH (10%) y TA cálidas (25°C) combinado con anoxia, sí resultó en una mayor germinación de aquenios comparado con aire normal. Esto podría deberse a que la ausencia de oxígeno impidió la respiración mitocondrial. El efecto de la anoxia en promover la SD en este caso (zona “D”) podría deberse a una menor actividad metabólica la cual se ha propuesto que inhibe la SD (discutida para el análisis de la zona “C” del modelo); en este sentido, las muestras de CH 10% en anoxia podrían presentar un estado metabólico similar al de muestras en la zona “C” donde predomina la vía fermentativa, con un menor efecto inhibitorio sobre la SD. Este efecto del metabolismo sobre la SD estaría dado por la producción de metabolitos (p.ej., ATP) por la glucólisis/ fermentación/respiración y que no se asocian directamente con las ROS. Sin embargo, no se ha propuesto aún un modelo que conecte el metabolismo primario con la SD en la post-maduración en seco de semillas ortodoxas. La mayor germinación observada en anoxia en estos experimentos parece contradecirse con el efecto promotor de la SD por tratamientos de hiperoxia reportados Morscher *et al.* (2015) y Buijs *et al.* (2018), donde semillas almacenadas bajo condiciones oxidativas controladas (RH 75%, 40°C y 75% O₂) o sistemas de alta presión parcial de O₂, aumentaron la SD. Esto sugiere que la reactivación del metabolismo podría afectar la SD de dos formas contrapuestas: (i) a través de la producción de metabolitos/energía metabólica (que inhiben la SD), y (ii) a través de las ROS (que promueven la SD). En este balance, la vía fermentativa inhibe la SD sin promoverla por ROS, mientras que la respiración mitocondrial inhibe la SD, pero la

producción de ROS puede eventualmente sobre compensar este efecto y promover la SD pero también el deterioro.

Es conocido el rol central que posee el ABA como determinante en el mantenimiento de la dormición. En girasol se ha observado que la atenuación de la dormición durante la post-maduración en seco está determinada por la pérdida de sensibilidad al ABA (Le Page-Degivry *et al.*, 1996, Bodrone *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018). Esto se confirmó nuevamente en este trabajo, y los cambios en dormición ocurridos en la zona “B” y “C” se asociaron con cambios en la capacidad germinativa de embriones en ABA (Fig. 4.4, 4.5, 4.6 y 4.9.A). Por otro lado, a diferencia de otras especies como cebada (Gubler *et al.*, 2008), trigo (Finkelstein *et al.*, 2016) y Arabidopsis (Ali-Rachedi *et al.*, 2004), donde el metabolismo de ABA en la semilla embebida cambia con el nivel de dormición, no se asociaron los niveles endógenos de ABA de los tratamientos de almacenaje con los patrones de SD (Fig. 4.9 B). Al mismo tiempo, se observó una mayor sensibilidad a etefón en condiciones que promovieron ciertos niveles de atenuación de la dormición (coincidiendo con la pérdida de dormición embrionaria) como fue en las zonas “C” y “D” de mayores HR/ψ_w (Fig. 4.13). La ausencia de respuesta a etefón en muestras con dormición profunda ubicadas en la zona “A” de menores HR/ψ_w también puede asociarse con una muy alta sensibilidad al ABA endógeno. El antagonismo entre ambas vías hormonales sobre la germinación se ha estudiado a nivel fisiológico, genético y molecular en muchas especies (Corbineau *et al.*, 2014). Las interacciones entre las vías de señalización de ambas hormonas son evidentes en los fenotipos de los mutantes de Arabidopsis con sensibilidad alterada al etileno y al ABA simultáneamente, de manera opuesta (por ej., *etr1*, *ein2*, *ein6* son insensibles a etileno y son hipersensibles a ABA). En girasol, este antagonismo fue observado por Corbineau *et al.*

(1990), donde aquenios post-madurados presentaron una mayor sensibilidad al etileno en comparación al momento de cosecha (con mayores niveles de dormición y sensibilidad al ABA). También en girasol se demostró que el ABA aumenta el requerimiento de etileno para promover la germinación de frutos de girasol dormidos (Corbineau y Côme, 1995, 2003).

Actualmente se desconocen cuáles son los mecanismos bioquímicos y/o moleculares que ocurren en cada una de las zonas de HR/ ψ_w de respuesta a la SD y como se podrían relacionar con los cambios observados en la señalización del ABA o del antagonismo ABA/etileno. Estudios en girasol disienten sobre el rol de cambios en los transcritos durante el almacenaje en seco (debido a reacciones de oxidación por ROS) sobre la pérdida de dormición (Bazin *et al.*, 2011^b; Meimoun *et al.*, 2014). Otros trabajos (Esashi *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995) sugirieron la participación de reacciones enzimáticas simples en los procesos de deterioro, y lo mismo podría plantearse para la SD. Por tratarse de reacciones que ocurren en ausencia de metabolismo fermentativo y respiratorio, deberían ser independientes de un suministro activo de ATP, y facilitadas por la proximidad de sustratos y catalizadores. En este sentido, se puede pensar en modificaciones postraduccionales que generen cambios en la actividad de proteínas regulatorias de la señalización hormonal, por ej., cambios en el nivel de fosforilación de reguladores transcripcionales como ABI5 (Skubacz *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2021).

Por otro lado, los procesos bioquímicos asociados con las zonas de HR se asociarían con cambios biofísicos del citoplasma de los tejidos del embrión (Walters, 1998). El agua celular en semillas con bajos CH se encuentra en estados sólidos amorfos de tipo “glassy”, o “rubber” ya que no tiene una estructura regular (característica de los cristales). La estructura “glassy” se distingue por tener muy alta viscosidad y menor volumen libre. El CH y la temperatura actúan relajando la estructura convirtiéndola en “rubber” (transición vítrea, Tg),

aumentando el volumen libre y la fluidez de la matriz, pudiendo tener grandes efectos en la tasa de reacciones químicas (p. ej. aumento del metabolismo que podrían inhibir la SD). Se plantea la posibilidad de que el umbral entre las zonas “B” y “C”, o entre las zonas “C” y “D” del modelo coincidan con la transición vítrea en el embrión. A su vez, estos cambios en las propiedades de la matriz sólida a nivel celular podrían asociarse con cambios en la formación de condensados celulares y condicionar de manera específica ciertas reacciones enzimática. Estudios recientes han demostrado que variaciones en el ψ_w de semillas embebidas inducen cambios reversibles en la formación de condensados de una proteína (FLOE1) y éstos modulan la capacidad germinativa de semillas de *Arabidopsis* (Dorone *et al.*, 2021). Lo interesante es que dentro de este sistema de compartimentalización de biomoléculas se identificaron distintos factores de transcripción como ABI5 (involucrado en la vía de señalización del ABA), siendo un punto interesante como mecanismo de regulación de expresión génica y/o control de vías de señalización. Se plantea la posibilidad de que esta proteína ABI5 varíe su actividad por modificaciones post-traduccionales las cuales podrían también resultar facilitadas por la formación de condensados en condiciones de ψ_w óptimas (zona “B” del modelo).

Los resultados de este capítulo resaltan la existencia de combinatorias de CH y TA que determinan condiciones de almacenaje que promueven la post-maduración en seco. El manejo postcosecha en la industria semillera (tanto en la etapa de mejoramiento como de producción de semilla híbrida comercial) debería orientarse en acondicionar la semilla y ser almacenada con HR menores al 65% (zona B). Esta condición permite optimizar la SD primaria y minimizar la proliferación de bacterias, hongos e insectos (Bewley *et al.*, 2013; Bradford *et al.*, 2018). En caso de que las condiciones de almacenaje superen la HR de 65%

(zona C) se recomendaría disminuir la TA ($<15^{\circ}\text{C}$) de manera de permitir el avance de la SD aun cuando esta se verá demorada con respecto a las condiciones óptimas. El impacto de estas condiciones “subóptimas” para la SD dependerá además del nivel de dormición al momento de cosecha, determinado por el genotipo y el ambiente materno. A altas HR ($>85\%$) ocurren grandes variaciones en las tasas de SD y de deterioro. El almacenaje de frutos con HR mayores a 85% puede resultar en una inhibición, un retraso o eventualmente con la promoción de la SD, pero con un avance significativo del deterioro oxidativo (magnificado por altas TA). La condición elegida finalmente, dependerá tanto de los medios e infraestructura (p. ej. secadoras de flujo, cámaras de refrigeración, entre otros), de los costos de acondicionamiento/almacenaje, como del ambiente de producción/almacenaje. Las condiciones ambientales presentes en la región central o Pampeana presentan HR medias anuales entre 69-79% y temperaturas medias anuales entre $14,8-19,5^{\circ}\text{C}$ (Aliaga, 2018); resaltando la importancia del manejo del acondicionamiento y ambiente de almacenaje postcosecha para la optimización de la SD y atenuación el deterioro oxidativo.

4.5. Conclusiones

Finalmente, se ha demostrado una compleja relación entre el CH y la TA, traducida en los posibles mecanismos implicados en la pérdida de dormición de los aquenios de girasol durante el almacenamiento en seco. Se ha planteado a la HR/ ψ_w de los frutos (determinado por las isotermas de sorción por combinatorias de CH y TA durante el almacenaje) como un buen predictor de los procesos de la dinámica de SD y el avance del deterioro. Desde un punto de vista práctico, estos resultados deberían llevar a prestar atención sobre las condiciones de almacenaje utilizadas tanto en experimentación como a escala industrial en el manejo postcosecha del aquenio como simiente. Además, la pérdida de sensibilidad al

ABA parecería ser un mecanismo potencialmente responsable de la SD durante el almacenaje. Futuros trabajos deberían avanzar en los posibles mecanismos (enzimáticos/no enzimáticos, oxidativos/hidrolíticos) que suceden en el estado “seco” en las semillas responsables de esta pérdida de dormición y su relación o no con los avances de los procesos de deterioro.

Capítulo 5: Discusión general

Resumen

En este capítulo (i) se retoma el marco conceptual de la problemática abordada con el fin de ampliarlo a partir de los conocimientos aportados en esta tesis. (ii) Se presenta un modelo de respuesta a la dormición en base a las hipótesis planteadas en el Capítulo 1 y se contrastarán con los resultados obtenidos en los Capítulos 2, 3 y 4, buscando integrar las contribuciones al estado de conocimiento. Luego, (iv) se puntualizan las aplicaciones desde el punto de vista agronómico de los resultados obtenidos, y (v) se detallan las implicancias para futuras investigaciones.

5.1. Marco conceptual de la problemática de dormición en girasol

Los frutos de girasol (aquenio) suelen tener altos niveles de dormición primaria al momento de la cosecha, lo que impide su germinación en un amplio rango de temperaturas de incubación (Cseresnyes 1979; Corbineau *et al.*, 1990). Los factores que predisponen la variabilidad fenotípica de dormición al momento de cosecha son el genotipo (Subrahmanyam *et al.*, 2002; Maiti *et al.*, 2006; Vujaković *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2017, 2019) y el ambiente del cultivo (o efectos maternos; Bodrone *et al.*, 2017; Lachabrouilli *et al.*, 2021; Riveira-Rubin *et al.*, 2021). Los niveles iniciales de dormición al momento de cosecha se pierden durante el almacenaje o post-maduración en seco, y la dinámica con que esto ocurre también depende del ambiente de almacenaje (Bazin *et al.*, 2011^a; Rodríguez *et al.*, 2018). Sin embargo, el peso relativo de estas fuentes de variación (genotipo, ambiente y almacenaje postcosecha) sobre los niveles de dormición no había sido hasta el momento evaluado en girasol.

Al ser la dormición un carácter que se mide indirectamente como la ausencia de germinación en condiciones estandarizadas (y estas condiciones varían entre grupos de investigación), se dificulta la integración de la información publicada por diversos autores. Todo esto hace que la información existente resulte insuficiente aun para su aplicación en la resolución de problemas asociados con la producción de semilla híbrida de girasol. El objetivo general de esta tesis fue explorar y conocer los posibles condicionantes de la dormición en *Helianthus annuus L.*, con especial interés en la variabilidad existente en los genotipos comerciales (objetivo I) como punto de partida para estudios más específicos enfocados en los mecanismos fisiológicos subyacentes (objetivo II), y la herencia del fenotipo de dormición de los parentales en la semilla híbrida (objetivo III). Finalmente, se investigó cómo el ambiente de almacenaje impacta sobre la dinámica de SD de aquenios y los posibles mecanismos detrás de esta respuesta (objetivo IV).

5.2. Modelo de respuesta de la dormición en base a las hipótesis planteadas en el Capítulo 1 y resultados obtenidos en los Capítulos subsiguientes (2, 3 y 4): integración de las contribuciones al estado de conocimiento

Hasta la actualidad, muy pocos trabajos han abordado la variabilidad intraespecífica de la dormición en el girasol cultivado (Subrahmanyam *et al.*, 2002; Maiti *et al.*, 2006; Vujaković *et al.*, 2012), y ninguno de éstos consideró un fenotipado de dormición que abarque distintos atributos (expresión en el rango térmico de incubación, rol de las estructuras del fruto, sensibilidad a hormonas). Aunque se han realizado numerosos estudios detallados sobre los aspectos fisiológicos de la dormición, éstos se basaron en unos pocos genotipos (Le Page *et al.*, 1989, 1992, 1996; Corbineau *et al.*, 1990; Gay *et al.*, 1991; Bianco *et al.*, 1994; Oracz *et al.*, 2008; Bazin *et al.* 2011^{a,b}; Roselló *et al.*, 2016; Vigliocco *et al.*, 2017, 2019). Por consiguiente, en esta tesis se llevaron a cabo estudios sobre una base de germoplasma más

amplio mediante el cultivo de los materiales bajo las mismas condiciones ambientales, aplicando una metodología única y completa de evaluación de la dormición. En base a los resultados obtenidos en esta tesis, se destaca una importante variabilidad genotípica para los principales atributos de la dormición, ampliando el marco conceptual sobre esta problemática (resumido en la Fig. 5.1). La hipótesis 1 (asociada al Objetivo I) planteaba que las cubiertas (pericarpio y cubierta seminal) imponen dormición en genotipos que expresan dormición a altas temperaturas, mientras que la dormición a bajas temperaturas se asocia con una mayor dormición embrionaria. Los resultados del Capítulo 2 llevaron a aceptar esta hipótesis. Las diferencias entre genotipos estarían dadas por niveles variables de sensibilidad al ABA (un atributo embrionario), y de un atributo restrictivo asociado con la morfología de las cubiertas. Lo que se denomina “dormición por cubiertas” parece responder a un efecto pasivo de las cubiertas, principalmente del pericarpio, a través de la resistencia al ingreso de O_2 en el fruto embebido y la imposición de hipoxia al embrión. Aunque la cubierta seminal tuvo un impacto menor comparado con el pericarpio, no se puede descartar que tenga un aporte significativo dentro del fruto intacto; posiblemente constituya una resistencia “en serie” con la ofrecida por el pericarpio para la difusión de O_2 .

La diversidad de patrones observados respondería a variaciones en la intensidad relativa de dos mecanismos, la DEBT y la TI, los cuales se intensifican en condiciones térmicas opuestas. Se concluyó que la presencia de un fenotipo determinado resulta de la superposición estos dos mecanismos que afectan diferencialmente la germinación a diferentes temperaturas de incubación: la DEBT, común para todos los genotipos evaluados en esta tesis, y la TI, presente en forma moderada en la mitad de los genotipos cultivados y

exacerbada en los silvestres (Fig. 2.3, 2.7; resumido en los tres fenotipos esquematizados en la Fig. 5.1).

La expresión de DEBT (o dormición primaria que se expresa en mayor medida a bajas temperaturas), resultó del rol predominante del embrión, donde las cubiertas imponen una restricción fisiológica temporal sobre éste (Corbineau *et al.*, 1990; Bianco *et al.*, 1994). En la Fig. 5.1 se observa que la atenuación de la dormición del fruto comienza por la pérdida de la dormición embrionaria, con antelación a la impuesta por cubiertas en todo el rango de temperaturas de incubación. Como consecuencia persiste temporalmente una dormición

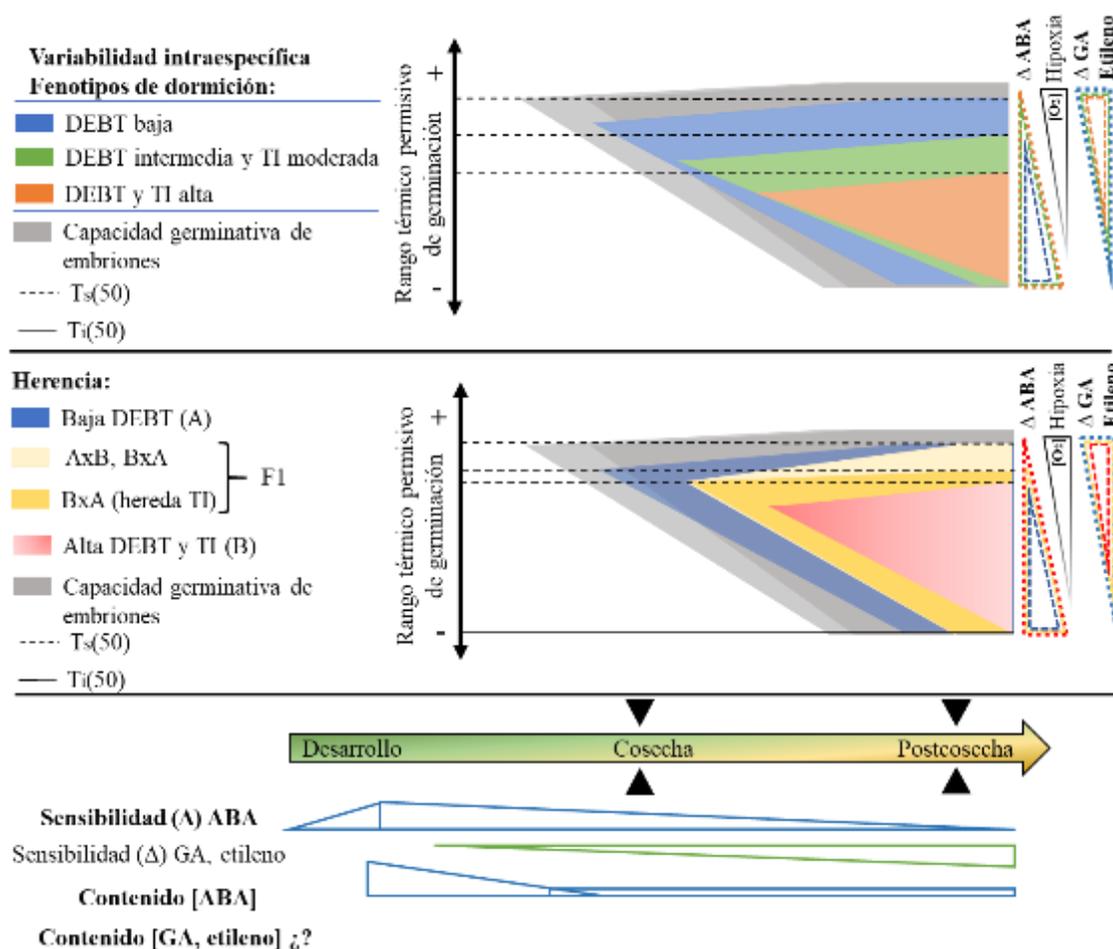


Fig. 5. 1. Modelo conceptual esquemático del control de la dormición en aquenios de girasol, generado a partir de los datos obtenidos en esta tesis. Se muestran los mecanismos fisiológicos implicados en la regulación de los fenotipos de dormición.

fisiológica del embrión impuesta por las cubiertas tanto a altas como a bajas temperaturas. Esta caída en los niveles de dormición se asocia con la menor sensibilidad al ABA, la cual también se atenúa hacia temperaturas más cálidas (Fig. 2.3, 2.6, 2.9). Debido a esto, la germinación de frutos se produce primero a altas temperaturas de incubación, como observaron Corbineau *et al.* (1990), Bodrone *et al.* (2017) y Rodríguez *et al.* (2018). Aquellos genotipos con mayores niveles de dormición (y en consecuencia una mayor DEBT) presentaron una persistencia más marcada de ambos componentes (embrionaria e impuesta por cubiertas) y predisposición a presentar TI (entre 25 y 30°C). Este mecanismo de DEBT (común tanto en genotipos cultivados como silvestres), se observa en el modelo como una disminución de la $T_i(50)$ en los tres fenotipos de dormición (Fig. 5.1).

Por otro lado, la restricción para germinar a altas temperaturas de incubación impuesta por el pericarpio y la cual no se atenúa con la post-maduración responde a lo que se denomina TI (Fig. 5.1, visto a través de la $T_s(50)$ para cada fenotipo de dormición). Este atributo, se encontró en las poblaciones silvestres (grupo 3 del *experimento 1*, Fig. 2.1; Cantamutto *et al.*, 2010; Presotto *et al.*, 2014) y también se expresó en cierto grado en varios genotipos cultivados (grupo 2 del *experimento 1*, Fig. 2.1; grupo 4 y 5 del *experimento 2*, Fig. 2.4; Gay *et al.*, 1991; Domínguez *et al.*, 2016, 2019). En el caso de este carácter parecen adquirir una mayor importancia ciertas características de las cubiertas, que confieren una menor permeabilidad y cierta susceptibilidad del embrión al ambiente impuesto por éstas. Esto nos llevaría a aceptar parcialmente la hipótesis 2.

En el caso de los girasoles cultivados permanecía como interrogante cuáles son las vías de herencia de la dormición (tanto la DEBT como la TI) en la F1 híbrida (objetivo III), ya que involucra la calidad de la semilla comercial. Los híbridos recíprocos evaluadas en el Capítulo

3 permitieron discernir entre el rol del embrión en la expresión de la DEBT y el efecto que imponen las cubiertas en la TI (ver esquema Fig. 5.2). Se pudo observar la presencia de una herencia mixta (Fig. 3.3), en primera medida dada por una dominancia incompleta donde el comportamiento intermedio de ambas F1 (indistintamente el sentido de la cruce) demostraron el rol predominante del cigoto por sobre las cubiertas en la DEBT (o dormición primaria/embrionaria). Esto también se insinuó en la respuesta de los híbridos recíprocos que fueron similares entre sí e intermedios a los parentales en cuanto a la sensibilidad del embrión al ABA y la respuesta del fruto a las GA/etefón (Fig. 3.4, 3.5). Estas evidencias llevan a aceptar la hipótesis 5.b, y no se demostró un tipo de herencia extra-nuclear o mitocondrial. Por otro lado, la TI presentó una herencia de tipo materna, dependiendo del genotipo de alta dormición en la cruce. Esta TI que estuvo impuesta por las cubiertas,

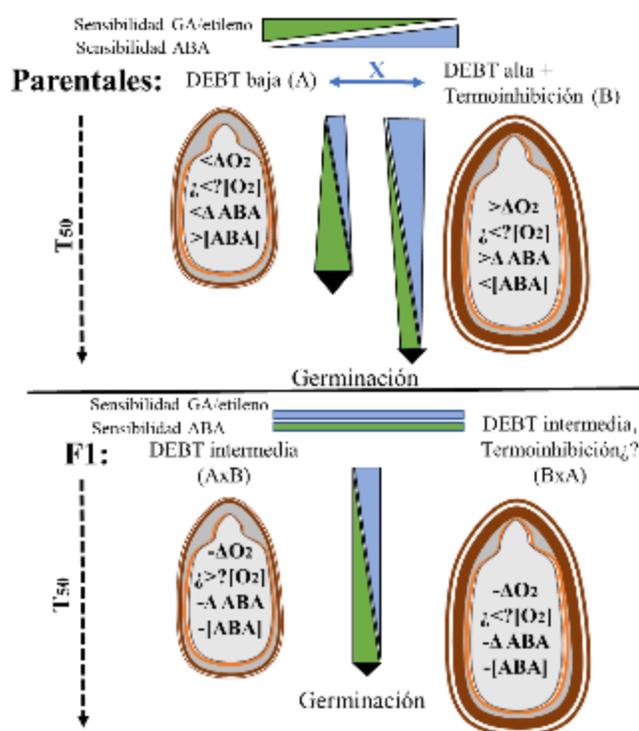


Fig. 5. 2. Modelo conceptual esquemático de la herencia de la dormición en agueros de girasol, y los mecanismos fisiológicos implicados en la regulación del fenotipo. El esquema fue generado a partir de los datos obtenidos en esta tesis (capítulo 2 y 3).

especialmente por el pericarpio, se transmitió a su F1, asociada con ciertas características morfológicas (p. ej. mayor grado de esclerosamiento y espesor del parénquima medio - Imagen 3.4-). Sin embargo, la expresión del fenotipo de TI dependió también del cigoto, particularmente de su sensibilidad al ABA y/o a la hipoxia (Fig. 3.8). Esto permite aceptar parcialmente la hipótesis 5.a, ya que la TI en girasoles cultivados no está sujeta solamente a las características de las cubiertas (como si sucede en poblaciones silvestres; Hernández *et al.*, 2017), sino también al comportamiento del embrión en interacción con las cubiertas (ver esquema en Fig. 5.1 y 5.2).

En la dormición de los aquenios presente a partir de cosecha, el metabolismo del ABA no parece ser relevante, y cumple un papel preponderante la pérdida de sensibilidad al ABA, coincidiendo con trabajos de la bibliografía (ver Fig. 5.1, 5.2) (Le Page-Degivry *et al.*, 1990; Le Page-Degivry y Garelo, 1992; Conti *et al.*, 2004; Bodrone *et al.*, 2017, Rodríguez *et al.*, 2018). Los resultados de los experimentos 3, 4 y 5 mostraron que tanto los distintos niveles de dormición de los aquenios entre genotipos (parentales e híbridos F1), su expresión diferencial en el rango térmico y su alivio durante la postcosecha se asociaron estrechamente con la capacidad germinativa de los embriones al ABA (Fig. 2.9, 2.10, 3.4, 3.7, [S 3.3](#)). Por otro lado, los niveles de ABA durante la incubación no se asociaron con los diferentes niveles de dormición. En los tres parentales evaluados en el Capítulo 3, se observó un aumento del ABA en la incubación (incluso siendo mayor en el genotipo de menor dormición) y esta respuesta no se modificó una vez disminuida la dormición en postcosecha (Fig. 3.6.A). Curiosamente, los niveles de ABA se asociaron en forma negativa con el nivel de dormición de los genotipos. En otras especies como *Arabidopsis* y cebada se han asociado positivamente los mayores niveles dormición con mayores contenidos endógenos de ABA (Ali-Rachedi *et*

al., 2004; Gubler *et al.*, 2005, 2008), mientras que en trigo y sorgo granífero no se observaron diferencias entre genotipos con dormición contrastante (Walker-Simmons, 1987; Benech-Arnold *et al.*, 2003; Gualano *et al.*, 2007). Similar a lo observado en girasol, en *Chenopodium quinoa* y *Brachypodium distachyon* se reportó que los contenidos endógenos de ABA se asociaron negativamente con el nivel de dormición de dos accesiones contrastantes (Barrero *et al.*, 2012; Ceccato *et al.*, 2015). Estas observaciones sugieren una posible regulación negativa de los niveles de ABA endógeno por parte de la señalización del ABA.

La respuesta germinativa a inhibidores de síntesis de ABA (Flurocloridona, Fluridone) no presentó una tendencia clara, sugiriendo que la síntesis *de novo* de ABA a partir de precursores carotenoides es poco relevante en la imposición de diferentes niveles de dormición como los observados entre genotipos. En los genotipos evaluados en el *experimento 3* (Capítulo 2; Fig. 2.9) y *4* (Capítulo 3; Fig. 3.4) no se observó un cambio en la respuesta germinativa en embriones aislados tanto al momento de cosecha como en postcosecha (una vez aliviada la dormición). Por otro lado, en el *experimento 5* (mismos genotipos evaluados que en el *experimento 4*), caracterizado por ser una fecha de siembra más tardía, se observaron ciertos niveles de respuesta a Fluridone en los 3 parentales al momento de cosecha (Fig. S. 3.3). La diferente respuesta al Fluridone en el *experimento 4* y *5* sugiere que la acumulación de ABA durante la incubación no depende exclusivamente de la síntesis actual de carotenoides, la cual es bloqueada por el Fluridone. Por ende, la síntesis de ABA podría ocurrir a partir de precursores ya acumulados que actúan “aguas abajo” en la ruta del metabolismo, o alternativamente, podría provenir de la hidrólisis de conjugados también acumulados en el embrión (Nambara *et al.*, 2010; Arc *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2020). Tampoco se observó respuesta a inhibidores de catabolismo de ABA

(Diniconazole) en los tres parentales evaluados (Cuadro 3.2). Durante el desarrollo de los frutos los contenidos endógenos de ABA no se asociaron con los niveles de dormición al momento de cosecha y postcosecha de los distintos genotipos. Sin embargo, se observó cierta respuesta a Fluridone reportando niveles de síntesis, de mayor relevancia comparado con momentos más avanzados de la maduración del fruto ([Fig. S. 3.6](#), [S. 3.7](#)). Esto coincide con lo reportado en estudios durante el desarrollo, donde la capacidad de síntesis de ABA resulto relevante en momentos tempranos del desarrollo (Le Page-Degivry *et al.*, 1990, 1996; Le Page-Degivry y Garello, 1992). Estas evidencias nos llevaron a rechazar la hipótesis 3.a (asociada al objetivo II) ya que el metabolismo del ABA en el aquenio embebido no se asoció positivamente con los niveles de dormición al momento de cosecha y durante la postcosecha. Conjuntamente, se investigó el posible rol de las cubiertas en la TI asumiendo que éstas inhiben fisiológicamente al embrión mediante la restricción al ingreso de O₂. Los aquenios de genotipos con TI (1579 y HA342), presentaron una mayor restricción para germinar en hipoxia (3%) a 30°C que genotipos sin TI (609; Fig. 3.8). Esta tendencia se repitió al evaluar la germinación de aquenios en hipoxia sobre parentales opuestos y sus híbridos recíprocos (Fig. 3.9). Por otro lado, la sensibilidad de los embriones al ABA en hipoxia se exacerbó mayoritariamente en los parentales de alta dormición y se alivió parcialmente durante el almacenaje postcosecha con la pérdida de dormición de los aquenios (Fig. 3.8 A vs. B). Sumando a las evidencias de una asociación negativa de los niveles de ABA con la dormición llevaría a aceptar parcialmente la hipótesis 3.b donde la hipoxia regula la TI a partir de la sensibilidad al ABA, pero no su metabolismo.

Otros reguladores de la dormición y el crecimiento como GA y etileno, mostraron no ser un requisito para el alivio de la dormición de los aquenios a partir de la cosecha, sino que es

necesario que se desencadene la pérdida de sensibilidad al ABA para que éstos comiencen a tener alguna injerencia, como se ha observado en otras especies (Hilhorst *et al.*, 1986; Karssen *et al.*, 1989; Steinbach *et al.*, 1995; Benech-Arnold *et al.*, 2000^b). Esto lleva a aceptar la hipótesis 4 (objetivo II). La capacidad de revertir la dormición y promover la germinación por parte de las GA y el etefón (etileno) se asoció negativamente con el nivel de dormición de los aquenios. Los genotipos con mayor nivel de dormición al momento de cosecha presentaron menor capacidad de respuesta a GA junto a etefón (Fig. 3.5), que fue adquirida gradualmente durante la postcosecha al disminuir los niveles de dormición (Fig. 5.1, 5.2). Esta capacidad germinativa adquirida por GA y etefón estuvo inversamente relacionada con la disminución de la sensibilidad de los embriones al ABA (Fig. 3.4, 3.7). Este patrón, siguió la misma lógica al observarse la expresión de la dormición en el rango térmico, donde la mayor DEBT estuvo relacionada con una mayor sensibilidad de embriones al ABA y una menor capacidad de respuesta a GA y etefón (Fig. 2.9, 3.4, 3.5). Por otro lado, la hipoxia no permitió revertir su efecto inhibitorio sobre la germinación ante el agregado de etefón (Fig. 3.8.C). Esto sugiere que el efecto del etileno en la promoción de la germinación estaría condicionado por la actividad de señalización del ABA, que se ve exacerbada con el aumento de la hipoxia (promovida por altas temperaturas de incubación). Además, la incubación con inhibidores de síntesis de GA (Trinexpack-etil) y etileno (CoCl₂) al momento de cosecha no tuvo ningún efecto sobre la germinación de los aquenios (Cuadro 3.2, 3.3), por lo cual la síntesis activa de estas hormonas no parecería ser un requisito para la atenuación de la dormición a partir de cosecha. El etileno actuaría interfiriendo con la vía de señalización del ABA y sin alterar su metabolismo, ya que la incubación en etefón de frutos no tuvo efectos sobre los niveles endógenos de ABA (Fig. 3.6.A).

El proceso por el cual los frutos pierden la dormición (post-maduración en seco) está regulado por factores del ambiente, principalmente el CH, la TA y (en algunos casos) el oxígeno (Bewley *et al.*, 2013). En numerosas especies se ha observado un patrón general de respuesta positiva de la SD a la TA (Hilhorst, 1995). Sin embargo, en girasol existe cierta controversia, tanto en la industria semillera como en la literatura, acerca del efecto que ejerce la TA (Cseresnyes, 1979; Brunick, 2007). Una posible razón es la existencia de interacciones entre la TA y el CH, como se observaron en otras especies (Foley, 1994; Basbouss-Serhal *et al.*, 2016). Bazin *et al.* (2011^a) estudiaron esta interacción en girasol, pero evaluando semillas (sin pericarpio), y observaron un patrón similar a *Arabidopsis*, donde la SD respondió positivamente a la TA en combinación con altos CH. Sin embargo, este trabajo no tuvo en cuenta el rol de las cubiertas sobre el comportamiento del fruto entero y no exploró valores de CH entre 5 y 10% que son los que normalmente se equilibran con la HR del ambiente (45-80%). En esta tesis se amplió el amplio rango de condiciones de almacenaje abarcando aquellas más frecuentes en la industria semillera, y se agregaron algunos tratamientos extremos (p. ej., almacenaje en freezer) usados experimentalmente para preservar el nivel de dormición inicial al momento de cosecha. Los resultados del Capítulo 4 (responde al objetivo IV) detectaron interacciones significativas entre el CH y la TA en el patrón de SD de los aquenios y embriones (Fig. 4.4, 4.5, 4.6, 4.7), llevando a aceptar la hipótesis 6.a. En base al supuesto de que las reacciones (cualquiera sea su naturaleza, enzimática o no) implicadas en la SD ocurren en medio acuoso y están limitadas por el estado termodinámico del agua, se estimó la HR (a_w) y ψ_w para cada una de las combinaciones de CH y TA. Se obtuvo un modelo que relaciona la TSDR (ver modelo Fig. 4.17, y esquema Fig. 5.3) en función de la HR/ ψ_w de equilibrio para cada tratamiento que permitió identificar cuatro “zonas” de

respuesta. En la zona “A” se inhibe totalmente la SD, en la zona “B” se promueve la SD, en las zonas “C” y “D” se promueve parcialmente la SD (los embriones germinan en agua, pero siguen siendo sensibles a ABA/cubiertas). En la zona “D” hay respiración (consumo de O_2), promoviendo el deterioro acelerado y la SD. En este caso el mecanismo promotor de la SD posiblemente involucre las ROS producidas en el embrión, las cuales también conducen al deterioro oxidativo de acuerdo con los trabajos de Bailly y colaboradores (Oracz *et al.*, 2007; Bazin *et al.*, 2011^a; Morscher *et al.*, 2015). Este mecanismo sería diferente al que opera en la SD en la zona “B”, y que optimiza la SD manteniendo una muy baja tasa de deterioro (o TDR, estimada según ecuaciones de Ellis y Roberts, 1980).

Tal como se comentó anteriormente en los resultados del Capítulo 2 y 3, la DEBT (o dormición primaria) estaría sujeta al estado fisiológico o potencial de crecimiento del

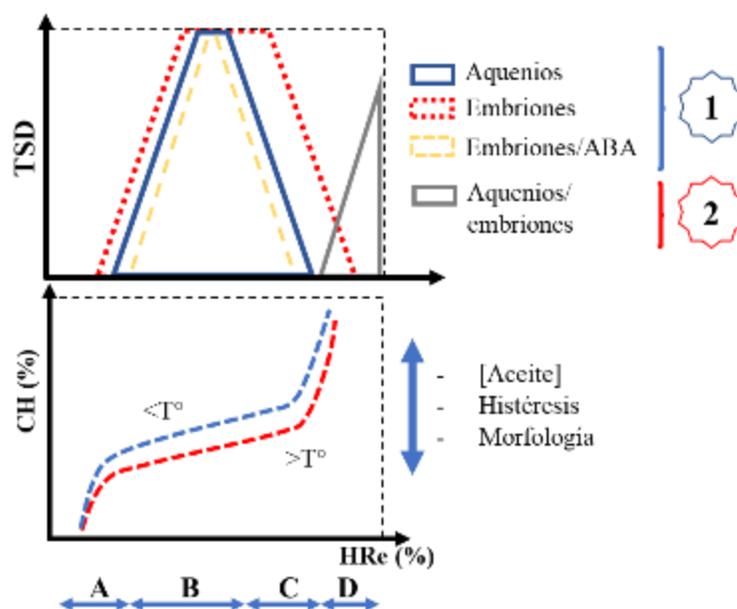


Fig. 5. 3. Esquema conceptual de la velocidad de SD primaria en frutos de girasol en función de la HRe a partir de los resultados del capítulo 4. Se muestra la SD de aquenios, embriones y sensibilidad de embriones al ABA en una primera zona de HRe intermedias que conforma una zona (1) de almacenaje seguro y SD óptima. Luego en HRe altas se muestra una zona de SD poca segura (2) debido al aumento pronunciado de procesos de deterioro. El panel inferior muestra un esquema de las relaciones de sorción entre el CH y la HRe en frutos de girasol para dos situaciones térmicas de almacenaje. Luego se detallan factores que pueden modificar esta relación de sorción (p. ej. contenido de aceite del fruto, histéresis, morfología).

embrión (siendo las cubiertas una restricción adicional que limitan su crecimiento). En aquellos tratamientos donde se promovió la pérdida de dormición, se observó en primera medida un aumento en la capacidad germinativa de los embriones en agua, seguido de un avance progresivo en la capacidad germinativa de los embriones en ABA (Fig. 4.4, 4.5, 4.6, 4.9.A). Por otro lado, no se observó una asociación entre el nivel de ABA endógeno y la capacidad adquirida para germinar de los aquenios en los tratamientos de almacenaje (CHxTA) que promovieron mayores tasas de SD (Fig. 4.9.B). Entonces se concluye que aquellas condiciones de almacenaje ($HR \approx 60\%$) que promovieron la SD de aquenios lo hicieron a través de cambios en la sensibilidad de los embriones al ABA (de acuerdo con Rodríguez *et al.*, 2017) y sin afectar los niveles endógenos de esta hormona. Estas evidencias llevarían a aceptar la hipótesis 6.b.

La promoción de la SD en la zona “B” del modelo (donde se optimizó la SD) no se asoció con los indicadores de deterioro evaluados (CE de semilla, MDA en eje embrionario, y vigor de plántulas luego de almacenaje prolongado de 7 meses; Fig. 4.13, 4.14, 4.15). A partir de un umbral cercano a una HR de 65% la SD respondió negativamente a valores crecientes de HR; en aquellas zonas de mayores HR y ψ_w (C y D, tratamientos de mayores CH y bajas TA se observó una disminución en la velocidad de SD en concordancia con el aumento de las TDR (Fig. 4.17, 5.3). Se planteó la posibilidad de que la menor germinación de frutos estuviera causada por una pérdida de vigor, y no por una menor velocidad de SD. Sin embargo, esta posibilidad se descartó luego de los ensayos de modificación de CH durante el almacenaje. Estos demostraron que la velocidad de SD primaria puede modularse en forma dinámica variando el CH. El proceso de SD parece ocurrir unidireccionalmente, y mayores CH (o valores de HR) solamente inhiben el proceso de SD, sin promover una entrada en

dormición secundaria. Estos cambios se observaron previo a la ocurrencia de avances marcados del deterioro (Fig. 4.16). Es así como ambos procesos parecen ser en cierta medida independientes entre sí (ver vectores ortogonales entre variables de dormición y deterioro, [Fig. S. 4.7.B](#)). De esta forma, las reacciones oxidativas (quizás de origen no-enzimáticas) no se asociaron con los patrones de deterioro y SD en las zonas B y C. Algunos autores no descartan la posibilidad de reacciones enzimáticas no dependientes de un suministro continuo de ATP (metabolismo activo) en esta zona de bajos niveles de hidratación (zona 2 de sorción) (Esashi *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995; Mira *et al.*, 2010). Por otro lado, el deterioro oxidativo (mediado por ROS) que desencadena la SD en la zona “D” a través de altos CH y TA cálidas (región 2 en la Fig. 5.3), concuerda con lo observado por Bazin *et al.* (2011^a). Sin embargo, este mecanismo alternativo de mayor actividad metabólica (respiratoria) implica altas probabilidades de deterioro y zona de almacenaje poco seguras. La presencia de estos dos mecanismos de SD llevaría a aceptar parcialmente esta hipótesis 6.c.

5.3. Aplicaciones desde el punto de vista agronómico de los resultados obtenidos.

Los resultados de esta tesis proveen evidencias que aclaran fuentes de variación en la dormición de girasol, y facilita la utilización de éstas como guía para diseñar estrategias de manejo que permitan disminuir esta problemática en la producción de semilla híbrida. A raíz del vacío de conocimiento planteado en el Capítulo 1, en la presente tesis surgió la necesidad de evaluar la variabilidad intraespecífica para atributos de dormición de girasol, e indagar en los posibles mecanismos fisiológicos. Dicha información resulta de importancia para obtener información básica sobre el funcionamiento de la dormición en genotipos diversos de girasol (Capítulo 2) y la posibilidad de desarrollar protocolos de fenotipado adecuados para los

programas de mejoramiento. La estandarización de los métodos para evaluar dormición a través de temperaturas fijas (p.ej. 25° en el poder germinativo según ISTA, 1999) puede arrojar información parcial y poco confiable para predecir el comportamiento germinativo de un genotipo, particularmente aquellos materiales con predisposición a presentar TI. La expresión de la dormición en el rango térmico de incubación, tanto a bajas temperaturas (DEBT) como a altas (TI) requiere que el fenotipado considere evaluar la germinación a diferentes temperaturas de incubación que las actualmente utilizadas en las pruebas de calidad de semillas (10°C para el “Cold Test”, y 25°C para poder germinativo; ISTA, 1999). La comparación de la germinación obtenida a 25 y 30°C permite detectar la presencia de TI, la cual puede ser problemática en algunos ambientes de producción de semilla híbrida o acentuarse en respuesta a tratamientos de curado.

El rango de condiciones térmicas del ambiente (dependiendo de la ubicación geográfica y fecha de siembra utilizada) para la siembra del cultivo del girasol suele explorar rangos más amplios que los utilizados en los métodos estandarizados de laboratorio (p. ej. poder germinativo a 25° según ISTA, 1999). Situaciones de siembras tempranas, sitios de altas latitudes y más continentales, establecen condiciones de bajas temperaturas durante la implantación que predispone a la DEBT y por consiguiente ocasionar problemas en el stand de individuos logrados del cultivo. Por otro lado, la importancia de ampliar el rango a 30°C se relaciona con la posibilidad de poder detectar la TI, que puede presentarse en forma moderada (pero persistente) en los genotipos cultivados, en comparación con las poblaciones silvestres. Condiciones del suelo que promuevan bajos ψ_w (p. ej. déficits hídricos) o hipoxia (p. ej., compactación y exceso hídrico), podrían exacerbar la TI aún a temperaturas menores (p. ej. 25°C) en situaciones de siembras “tardías” o “de segunda” durante el verano (Huo y

Bradford, 2015). Adicionalmente, la aplicación de polímeros como parte del “curado” de la semilla podría aumentar la resistencia al O₂ y promover la TI a temperaturas de incubación menores (corrimiento de la T_s(50) hacia valores más bajos).

El control genético de la dormición no pareció estar ligado a los principales caracteres objeto del mejoramiento en los girasoles aceiteros. Los caracteres de mejora más relevantes, como peso-tamaño del fruto, relación pepita/pericarpio y contenido de aceite, no se asociaron con los niveles de dormición entre los girasoles cultivados evaluados en esta tesis ([Fig. S. 2.3.B](#)).

La ausencia de una relación entre la morfología del embrión y la DEBT también fue notable al comparar los híbridos provenientes de cruzamientos recíprocos entre parentales con diferente DEBT y tamaño de fruto. La intensidad de la DEBT del aquenio (así como la sensibilidad del embrión al ABA) dependió del genotipo del cigoto (y los híbridos fueron similares entre sí) aun cuando la morfología del fruto estuvo determinada por la madre (y los híbridos fueron tan diferentes entre sí como los parentales). Otro resultado a destacar fue la asociación entre el tiempo a floración y los niveles de dormición, donde parecería que genotipos con ciclos más precoces podrían presentar menores problemas de dormición ([Fig. S. 2.3](#)). Un resultado similar pudo observarse en sorgo granífero, en un trabajo del grupo donde se evaluó un panel de unos 20 genotipos (Rodríguez *et al.*, 2021). Estas asociaciones entre los caracteres dormición de grano y tiempo a floración posiblemente reflejan la participación de genes regulatorios comunes en ambas vías, como se ha observado en *Arabidopsis thaliana* (Auge *et al.*, 2019).

Conjuntamente, a partir de la información generada se determinaron los patrones de herencia para dichos atributos encontrados sobre la F1 híbrida que permita optimizar o diseñar los cruzamientos durante la etapa de mejora y/o producción de semilla híbrida (Capítulo 3). Una

herencia de tipo incompleta determina que la F1 híbrida presente menores niveles de dormición ante la presencia de un parental de alta dormición en la cruce. Además, la dirección del cruzamiento no afecta el fenotipo de la F1, a menos que el parental de alta dormición presente TI. Esta última puede ser heredada en la progenie por vía materna, predispuesta por cubiertas de mayor grosor y esclerosamiento como de una alta sensibilidad del embrión al ABA/hipoxia. Poder determinar la dirección de un cruzamiento cuando uno de los parentales presenta tendencia a la TI (siempre que la herencia de otros caracteres de interés lo permita) resultará de importancia práctica en la obtención de semilla híbrida con alta calidad germinativa.

Finalmente, se establecieron condiciones de almacenaje de CH y TA que permiten optimizar la velocidad de SD de los aquenios, minimizando los procesos de deterioro (Capítulo 4). Resulta una herramienta importante de manejo durante la postcosecha que da la facultad de disminuir los tiempos de acceso al material simiente con estándares de calidad germinativa acorde a las normativas de mercado y/o acelerar el avance de generaciones en un programa de mejoramiento. Aquellas condiciones que determinen HR cercanas al 60-65% (CH 6% y TA de 15-20°C) bastan para optimizar la SD de un genotipo/lote determinado. Debe tenerse en cuenta que almacenamientos con CH mayores a este valor requerirá de una disminución en la TA (que permita disminuir la HRe).

5.4. Implicancias para futuras investigaciones

Los resultados obtenidos sugieren nuevas preguntas en relación con los mecanismos que estarían regulando la dormición en girasol. En términos generales, se observó que la sensibilidad al ABA es una vía común en regulación de los niveles de dormición tanto entre genotipos, su expresión en el rango térmico (tanto en la DEBT como la predisposición para

presentar TI), los patrones de herencia en la F1 y detrás de los mecanismos que promueve la SD durante el almacenaje “en seco”. Además, los niveles endógenos de ABA no tuvieron una injerencia directa sobre los niveles de dormición, incluso entre genotipos siguió un patrón inverso. Por otro lado, la sensibilidad a GA o etileno se asoció en forma contrapuesta con la sensibilidad al ABA. La vinculación entre las vías hormonales del etileno, GA y ABA, la hipoxia y la dormición fue demostrada en *Arabidopsis thaliana* recientemente por Wang *et al.* (2018). La promoción de la germinación por etileno requiere de la vía N-End rule pathway funcional; a su vez, esta vía regula la señal del ABA a través de cambios en la expresión de ABI5. Una forma de abordar estas interacciones a nivel molecular en girasol sería mediante el análisis de expresión de genes ortólogos que codifican para los componentes de las vías de señalización de ABA, GA y etileno, y evaluar si responden a los niveles de O₂ y temperaturas de incubación que promueven TI. Con relación al rol que cumplen el pericarpio junto con la cubierta seminal en la imposición de la dormición por cubiertas a altas temperaturas de incubación (TI) falta aún cuantificar los niveles de hipoxia *in situ* que se establecen en el embrión, y asociar estos niveles de O₂ con cambios en la sensibilidad al ABA y al etileno mediante la N-End rule pathway (Gibbs *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018). Además, sería interesante evaluar aspectos fisiológicos y genéticos, involucrados en la biosíntesis y deposición de pared secundaria en el esclerénquima durante la histogénesis del pericarpio, tejido que parecería conferir una baja permeabilidad, resistencia mecánica (rigidez) e hidrofobicidad a las cubiertas. En girasol, faltaría integrar los cambios fisiológicos a nivel del embrión y su relación con los cambios histológicos de las cubiertas en la región micropilar que ocurren durante la dinámica de germinación. En especies como *Arabidopsis*, tabaco y lechuga, se ha demostrado que el endosperma micropilar integra las señales ambientales con

las redes hormonales que median la dormición y la germinación de las semillas. Este proceso implica la acción de enzimas que actúan sobre arquitectura de la pared celular y así debilitar la resistencia física del endosperma (Sung *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012).

El mejoramiento genético sería una alternativa para reducir el exceso de dormición en girasoles cultivados, dado que existe variabilidad intraespecífica para el nivel de dormición (DEBT) y la presencia de TI (como se muestra en esta tesis). A partir de estudios de mapeo de QTL o de mapeo por asociación (GWAS) se podrían obtener marcadores moleculares útiles para el mejoramiento genético. Resulta una alternativa interesante el uso de poblaciones biparentales que podrían derivar de algunos de los materiales utilizados en esta tesis (F1 generadas en el Capítulo 3) para el mapeo de QTL de dormición.

Actualmente, no se conocen los mecanismos bioquímicos que ocurren en cada una de las zonas de HR/ ψ_w de respuesta a la SD. Tampoco se conoce como se podrían relacionar con los cambios en la señalización del ABA que ocurren en semillas con niveles de hidratación tan bajos. Nuestros resultados no permiten descartar las reacciones de oxidación por ROS como desencadenante de la pérdida de dormición (Oracz *et al.*, 2007; Bailly *et al.*, 2008, 2019; Meimoun *et al.*, 2014; Bazin *et al.*, 2011^b). Sin embargo, los cambios en sensibilidad del embrión al ABA, en ausencia de deterioro oxidativo, sugieren la acción un mecanismo de alta especificidad, apuntando a una posible actividad enzimática. La relación entre estas posibles reacciones de SD, y el aumento del metabolismo (fermentativo y aeróbico) no se ha establecido en semillas, aunque la idea de que el metabolismo “inhibe” la SD fue planteada anteriormente (Leopold, 1988; Foley, 1994). El análisis de los perfiles metabólicos de los embriones en cada zona de respuesta de SD podría ser informativo con respecto a esta relación inversa entre metabolismo primario y SD. Otros aspectos para evaluar podrían ser

cambios en la metilación del ADN con relación al tratamiento de secado y durante el almacenaje (Michalak *et al.*, 2013), y/o cambios en el nivel de fosforilación de proteínas, como posibles mecanismos de regulación de la vía de señalización de ABA. También es sugestivo que la proteína ABI5 tiene un tipo de dominio “intrínsecamente desordenado” lo que favorece la formación de condensados dentro de los cuales podrían producirse reacciones en un medio prácticamente libre de agua (Dorone *et al.*, 2021). Un aspecto clave del análisis de las zonas definidas por el modelo de tasas de SD en función de la HR y que no fue evaluado en esta tesis, es el que refiere a la biofísica de los frutos, mediante técnicas de DSC (Walters, 1998). Se espera que la temperatura de transición vítrea (Tg) para los diferentes CH evaluados se asocie con alguno de los umbrales observados en el modelo, p. ej., entre las zonas “B” y “C”, el cual también coincide con el umbral para la actividad biológica de microorganismos. No se encontraron en la literatura previa trabajos en los que se haya descrito una regulación tan marcada de la SD por la HR y abarcando un rango tan amplio de temperaturas, y las respuestas en otras especies podrían no ser las mismas. En este sentido, el girasol ofrece un sistema experimental único para investigar las reacciones detrás de la SD durante el almacenaje en seco, actualmente lejos de estar esclarecidas en ninguna especie.

BIBLIOGRAFIA

- Akimoto, T., Cho, S., Yoshida, H., Furuta, H., y Esashi, Y. (2004).** Involvement of Acetaldehyde in Seed Deterioration of Some Recalcitrant Woody Species through the Acceleration of Aerobic Respiration. *Plant and Cell Physiology*, 45(2), 201–210. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch023>
- Aliaga, V.S. (2018).** Variabilidad climática de la Región Pampeana y su efecto sobre las lagunas de la región. Tesis de doctorado en Geografía Autora. Universidad Nacional del Sur. DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/huellas-2020-2413>
- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M. H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P., y Jullien, M. (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(3), 479–488. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1251-4>
- Allen PS, Meyer SE y Beckstead J (1995)** Patterns of seed after-ripening in *Bromus tectorum* L. *Journal of Experimental Botany* 46, 1737–1744.
- Arata, G. J., Riveira-Rubin, M. A., Batlla, D., y Rodríguez, M. V. (2021).** Dormancy attributes in Sunflower achenes (*Helianthus annuus* L.): I. Intraspecific variability. *Crop Science*, (February), 1–16. <https://doi.org/10.1002/csc2.20610>
- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., y Marion-Poll, A. (2013).** ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4(MAR), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00063>
- Argyris, J., Dahal, P., Hayashi, E., Still, D. W., y Bradford, K. J. (2008).** Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. *Plant Physiology*, 148(2), 926–947. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125807>
- Auge, G. A., Penfield, S., y Donohue, K. (2019).** Pleiotropy in developmental regulation by flowering-pathway genes: is it an evolutionary constraint? *New Phytologist*, 224(1), 55–70. <https://doi.org/10.1111/nph.15901>
- Bailly, C. (2019).** The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *The Biochemical Journal*, 476(20), 3019–3032. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190159>
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., y Corbineau, F. (2008).** From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus - Biologies*, Vol. 331, pp. 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.022>
- Baldos, O. C., DeFrank, J., Kramer, M., y Sakamoto, G. S. (2014).** Storage Humidity and Temperature Affect Dormancy Loss and Viability of Tanglehead (*Heteropogon contortus*) Seeds. *HortScience*, 49(10), 1328–1334. <https://doi.org/10.21273/hortsci.49.10.1328>
- Barrero, J. M., Talbot, M. J., White, R. G., Jacobsen, J. V., y Gubler, F. (2009).** Anatomical and transcriptomic studies of the coleorhiza reveal the importance of this tissue in regulating dormancy in Barley1[W]. *Plant Physiology*, 150(2), 1006–1021. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137901>
- Basak, N., y Mukherjee, S. K. (1997).** The Morphology and Anatomy of the Cypselas of Some Species of *Helianthus* L. (Asteraceae- Heliantheae) and its Taxonomic Significance. *Nat. Bot. Soc. i 55* : 111-124.
- Basbous-Serhal I, Leymarie J and Bailly C (2016)** Fluctuation of *Arabidopsis* seed dormancy with relative humidity and temperature during dry storage. *Journal of Experimental Botany* 67, 119–30.
- Baskin JM y Baskin CC (1976)** High temperature requirement for afterripening in seeds of winter annuals. *New Phytologist* 77, 619–624.
- Baskin JM y Baskin CC (1986)** Temperature requirements for afterripening in seeds of nine winter annuals. *Weed Research* 26, 375–380.
- Batlla, D. y Benech-Arnold, R. L (2010)** Predicting changes in dormancy level in natural seed soil banks. *Plant Molecular Biol.* 73, Pag 3-13.

- Batlla, D., y Benech-Arnold, R. L. (2015).** A framework for the interpretation of temperature effects on dormancy and germination in seed populations showing dormancy. *Seed Science Research*, 25(2), 147–158. <https://doi.org/10.1017/S0960258514000452>
- Bauer MC, Meyer SE and Allen PS (1998)** A simulation model to predict seed dormancy loss in the field for *Bromus tectorum* L. *Journal of Experimental Botany* 49, 1235–1244.
- Bazin J, Batlla D, Dussert S, El-Maarouf-Bouteau H and Bailly C (2011^a)** Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *Journal of Experimental Botany* 62, 627–640.
- Bazin J, Langlade N, Vincourt P, Arribat S, Balzergue S, El-Maarouf Bouteau H and Bailly C (2011^b)** Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening. *Plant Cell* 23, 2196–2208.
- Benech-Arnold, R.L., Sánchez, R.A., Forcella, F., Kruk, B.C. y Ghera, C.M. (2000^a).** Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research*, 67: 105-122.
- Benech-Arnold, R.L., Enciso, S., Sánchez, R.A., Carrari, F., Pérez-Flores, L., Iusem, N., Steinbach, H., Lijavetzky, D. y Bottini, R. (2000^b).** Involvement of ABA and GAs in the regulation of dormancy in developing sorghum seeds. Pp. 101-111 en Black, M., Bradford, K. y Vázquez-Ramos, J. (eds.). *Seed Biology: Advances and applications*. CAB International, Oxon, UK.
- Benech-Arnold R.L., Gualano N., Leymarie J., Côme D. y Corbineau F. (2006).** Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryo of dormant barley grains. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1423-1430.
- Benech-Arnold, R. L., Rodríguez, M. V., Sánchez, R. A., Carrari, F., Pérez-Flores, L., Osuna-Fernández, H. R., ... Bottini, R. (2003).** Physiological and molecular aspects of the control of dormancy and germination in developing sorghum caryopses. *The Biology of Seeds: Recent Research Advances. Proceedings of the Seventh International Workshop on Seeds*, Salamanca, Spain, 2002, 11–23. <https://doi.org/10.1079/9780851996530.0011>
- Benech-Arnold, R.L., Rodríguez, M.V y Batlla, D. (2012)** Aspects of the Physiology of Seed Dormancy in Relation to its Implications for Agriculture. In: *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*, Eds: Robert A. Meyers. Section Editors: Paul Christou, R. Savin. Editorial Springer. ISBN: 978-0-387-89469-0. Pp. 1425-1435.
- Bethke PC, et al. (2007).** The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol* 143:1173–1188.
- Bewley J. D. (1997).** Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9:1055-1066.
- Bewley, J.D. y M. Black (1994).** Seeds: physiology of development and germination. Second edition. Plenum Press, New York.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. y Nonogaki, H. (2013).** Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. *3rd Edition, Springer, New York*.
- Bianco, J., Garelo G. y Le Page-Degivry M. T. (1994).** Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. *Seed Science Research* 4: 57-62.
- Bodrone, M. P., Rodríguez, M. V., Arisnabarreta, S., y Batlla, D. (2017).** Maternal environment and dormancy in sunflower: The effect of temperature during fruit development. *European Journal of Agronomy*, 82, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.10.007>
- Bodrone, P. (2014).** Cambios en el nivel de dormición de semillas de girasol en función del ambiente térmico explorado durante la etapa de desarrollo-maduración de los frutos y el almacenaje postcosecha. Magíster en Producción Vegetal. EPG-FAUBA.
- Boesewinkel, F.D. y Bouman, F. (1995)** The Seed: Structure and Function. In: Kigel, J. and Galili, G., Eds., *Seed Development and Germination*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1-24.
- Bradford, K. J., Dahal, P., Van Asbrouck, J., Kunusoth, K., Bello, P., Thompson, J., y Wu, F. (2018).** The dry chain: Reducing postharvest losses and improving food safety in humid climates. *Trends in Food Science and Technology*, 71(July 2017), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.002>

- Braz, M.R.S., C.S. Barros, F.P. Castro and C.A.V. Rossetto, (2008).** Accelerated aging and controlled deterioration seeds vigour tests for sunflower. *Cienc. Rural*, 38: 1857-1863. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000700009>
- Brunick, R. (2007).** Seed dormancy in domesticated and wild sunflowers (*Helianthus annuus L.*): types, longevity and QTL discovery. Dissertation submitted to Oregon State University for the degree of Doctor of Philosophy.
- Buijs, G., Kodde, J., Groot, S. P. C., y Bentsink, L. (2018).** Seed dormancy release accelerated by elevated partial pressure of oxygen is associated with DOG loci. *Journal of Experimental Botany*, 69(15), 3601–3608. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery156>
- Cadman, C. S. C., Toorop, P. E., Hilhorst, H. W. M., y Finch-Savage, W. E. (2006).** Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant Journal*, 46(5), 805–822. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02738.x>
- Camacho Páez, B., Medina, A. R., Rubio, F. C., Moreno, P. G., y Grima, E. M. (2003).** Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(6), 845–853. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00219-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00219-9)
- Cantamutto, M., Presotto, A., Fernandez Moroni, I., Alvarez, D., Poverene, M., y Seiler, G. (2010).** High infraspecific diversity of wild sunflowers (*Helianthus annuus L.*) naturally developed in central Argentina. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(5), 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2009.12.009>
- Castillo, F. M., Vásquez, S. C., y Calderini, D. F. (2017).** Does the pre-flowering period determine the potential grain weight of sunflower? *Field Crops Research*, 212(March), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.06.029>
- Ceccato, D., Bertero, D., Batlla, D., y Galati, B. (2015).** Structural aspects of dormancy in quinoa (*Chenopodium quinoa*): Importance and possible action mechanisms of the seed coat. *Seed Science Research*, 25(3), 267–275. <https://doi.org/10.1017/S096025851500015X>
- Chahtane, H., Kim, W., y Lopez-Molina, L. (2017).** Primary seed dormancy: A temporally multilayered riddle waiting to be unlocked. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 68, pp. 857–869. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw377>
- Chantre GR, Sabbatini MR y Orioli GA (2009)** Effect of burial depth and soil water regime on the fate of *Lithospermum arvense* seeds in relation to burial time. *Weed Research* 49, 81–89.
- Conti, A., S. Pancaldi, M. Fambriniet et al. (2004).** A deficiency at the gene coding for ζ -carotene desaturase characterizes the sunflower non-dormant-1 mutant. *Plant Cell Physiol*. 45(4): 445–455 (2004).
- Corbineau, F. y Côme, D. (1995).** Control of seed germination and dormancy by gaseous environment, in *Seed Development and Germination*, eds J. Kigel and G. Galili (New York: Marcel Dekker), 397–424.
- Corbineau, F. y Côme, D. (2003).** Germination of sunflower seeds as related to ethylene synthesis and sensitivity – an overview, in *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III*, eds M. Vendrell, H. Klee, J. C. Pech, and F. Romojaro (Amsterdam: IOS Press), 216–221.
- Corbineau, F., Bagniol S. y Côme D. (1990).** Sunflower seed dormancy and its regulation by ethylene. *Israel J of Botany* 39: 313-325.
- Corbineau, F., Rudnicki, R. y D. Côme (1989).** ACC conversion to ethylene by sunflower seeds in relation to maturation germination and termodormancy. *Plant Growth Regulation*. 8. 105-115.
- Dai, M., Xue, Q., Mccray, T., Margavage, K., Chen, F., Lee, J.-H., ... Wang, H. (2013).** The PP6 Phosphatase Regulates ABI5 Phosphorylation and Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(2), 517–534. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105767>
- De Giorgi J, Piskurewicz U, Loubery S, Utz-Pugin A, Bailly C, Mène-Saffrané L, et al. (2015).** An Endosperm-Associated Cuticle Is Required for Arabidopsis Seed Viability, Dormancy and Early Control of Germination. *PLoS Genet* 11(12): e1005708. doi: 10.1371/journal.pgen.1005708
- Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, y Koornneef M (2000).** Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol* 122:403–414.

- De-Paula, O. C., Marzinek, J., Oliveira, D. M. T., y Machado, S. R. (2013).** The role of fibres and the hypodermis in Compositae melanin secretion. *Micron*, 44(1), 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.08.003>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2018).** InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dominguez C., Batlla D., Rodríguez M.V., Windauer L.B., Gerbaldo M. y Benech-Arnold R.L. (2016).** Pericarp-Imposed Dormancy in Sunflower: Physiological Basis, Impact on Crop Emergence, and Removal at an Industrial Scale. *Crop Sci.* 56:716–726.
- Dominguez, C.P., Rodríguez, M.V., Batlla, D., García de Salamone, I., Andreani, A. y R.L. Benech-Arnold (2017).** Sensitivity to hypoxia and microbial activity are instrumental for pericarp-imposed dormancy expression in sunflower. Proceedings of the Triennial Conference of the International Society for Seed Science, Monterey, California, Estados Unidos.
- Dorone, Y., Boeynaems, S., Flores, E., Jin, B., Hateley, S., Bossi, F., ... Rhee, S. Y. (2021).** A prion-like protein regulator of seed germination undergoes hydration-dependent phase separation. *Cell*, 184(16), 4284–4298.e27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.009>
- Drapron, R. (1985).** Enzyme Activity as a Function of Water Activity. Properties of Water in Foods, 171–190. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5103-7_11
- Eenink, A.H. (1981).** Seed dormancy in lettuce: Influence of temperature on induction and expression of seed dormancy and studies on the inheritance. *Acta Hortic.* 111, 41-46. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1981.111.4>
- Ellis RH, Hong TD y Roberts EH (1995)** Survival and vigour of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds stored at low and very-low moisture contents. *Annals of Botany* 76, 521–534
- Ellis, R. H., Hong, T. D., y Roberts, E. H. (1989).** A comparison of the low-moisture-content limit to the logarithmic relation between seed moisture and longevity in twelve species. *Annals of Botany*, 63(6), 601–611. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087788>
- Ellis, R. H., y Roberts, E. H. (1980).** Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45(1), 13–30. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a085797>
- Esashi, Y., Ogasawara, M., Górecki, R., y Leopold, A. C. (1993).** Possible mechanisms of afterripening in *Xanthium* seeds. *Physiologia Plantarum*, 87(3), 359–364. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01742.x>
- Esau, K. (1977).** Anatomy of Seed Plants (2nd ed.). John Wiley y Sons.
- Fedi F., O'Neill C.M., Menard G., Trick M., Dechirico S., Corbineau F., Bailly C, Eastmond P.J., Penfield S. (2017).** Awake1, an ABC-type transporter, reveals an essential role for suberin in the control of seed dormancy. *Plant Physiology Preview*. Published as DOI:10.1104/pp.16.01556.
- Fernández Farnocchia, R. B., Benech-Arnold, R. L., y Batlla, D. (2019).** Regulation of seed dormancy by the maternal environment is instrumental for maximizing plant fitness in *Polygonum aviculare*. *Journal of Experimental Botany*, 70(18), 4793–4805. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz269>
- Fernández-Marín, B., Kranner, I., Sebastián, M. S., Artetxe, U., Laza, J. M., Vilas, J. L., ... García-Plazaola, J. I. (2013).** Evidence for the absence of enzymatic reactions in the glassy state. A case study of xanthophyll cycle pigments in the desiccation-tolerant moss *Syntrichia ruralis*. *Journal of Experimental Botany*, 64(10), 3033–3043. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert145>
- Finch-Savage, W. E., & Bassel, G. W. (2015).** Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. *Journal of Experimental Botany*, 67(3), 567–591. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv490>
- Finch-Savage, W. E. y Leubner-Metzger, G. (2006).** Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501-523.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., y Steber, C. (2008).** Molecular Aspects of Seed Dormancy. Annual Review of Plant Biology, 59(1), 387–415. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740>
- Foley ME (1994)** Temperature and water status of seed affect after-ripening in wild oat (*Avena fatua*) *Weed Science* 42, 200–204.

- Foley, M. E., y Fennimore, S. A. (2008).** Genetic basis for seed dormancy. *Seed Science Research*, 8(2), 173–182. <https://doi.org/10.1017/s0960258500004086>
- Fonseca, A. (2000).** Efecto de la temperatura durante el llenado del grano sobre el comportamiento de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Trabajo de Intensificación para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Gandhi, S. D., Heesacker, A. F., Freeman, C. A., Argyris, J., Bradford, K., y Knapp, S. J. (2005).** The self-incompatibility locus (S) and quantitative trait loci for self-pollination and seed dormancy in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(4), 619–629. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-1934-7>
- Gay, C., Corbineau, F., & Côme, D. (1991).** Effects of temperature and oxygen on seed germination and seedling growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 31(2), 193–200. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(91\)90070-5](https://doi.org/10.1016/0098-8472(91)90070-5)
- Gibbs, D. J., MdIsa, N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G. M., Berckhan, S., ... Holdsworth, M. J. (2014).** Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. *Molecular Cell*, 53(3), 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.020>
- Gibbs, D.J., Lee S.C., Nurulhikma MI, Gramuglia S., Fukao T, Bassel GW, Sousa Correia C., Corbineau F., Theodoulou F.L., Bailey-Serres J, and Holdsworth M.J. (2011)** Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N end rule pathway in plants. *Nature*. 479(7373): 415–418.
- Gonai, T., Kawahara, S., Tougou, M., Satoh, S., Hashiba, T., Hirai, N., ... Yoshioka, T. (2004).** Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *Journal of Experimental Botany*, 55(394), 111–118. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh023>
- Groot, S. P. C., y Karszen, C. M. (1992).** Dormancy and Germination of Abscisic Acid-Deficient Tomato Seeds. *Plant Physiology*, 99(3), 952–958. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.952>
- Gu, X. Y., Chen, Z. X., y Foley, M. E. (2003).** Inheritance of seed dormancy in weedy rice. *Crop Science*, 43(3), 835–843.
- Gualano, N., Carrari, F., Rodríguez, M. V., Pérez-Flores, L., Sánchez, R., Iusem, N., y Benech-Arnold, R. (2007).** Reduced embryo sensitivity to abscisic acid in a sprouting-susceptible sorghum (*Sorghum bicolor*) variety is associated with altered ABA signalling. *Seed Science Research*, 17(2), 81–90. <https://doi.org/10.1017/S0960258507708115>
- Gualano, N., Del Fueyo, P. y RL Benech-Arnold (2014).** Potential longevity (Ki) of malting barley (*Hordeum vulgare* L.) grain lots relates to their degree of pre-germination assessed through different industrial quality parameters. *Journal of Cereal Science*. 60.
- Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV (2005).** Dormancy release, ABA and pre- harvest sprouting. *Curr Opin Plant Biol* 8: 183–187.
- Gubler, F., Hughes, T., Waterhouse, P., y Jacobsen, J. (2008).** Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: Effects on abscisic acid and gibberellin metabolism. *Plant Physiology*, 147(2), 886–896. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115469>
- Hancock J.F. (2012)** Plant Evolution and the Origin of Crop Species. Wallingford, UK: CABI.
- Heath, R. L., y Packer, L. (1968).** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hernández, F., Lindström, L. I., Parodi, E., Poverene, M., y Presotto, A. (2017).** The role of domestication and maternal effects on seed traits of crop–wild sunflower hybrids (*Helianthus annuus*). *Annals of Applied Biology*, 171(2), 237–251. <https://doi.org/10.1111/aab.12368>
- Hernández, F., Poverene, M., Garayalde, A., y Presotto, A. (2019).** Re-establishment of latitudinal clines and local adaptation within the invaded area suggest rapid evolution of seed traits in Argentinean sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biological Invasions*, 8. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-01998-8>
- Hilhorst, H.W.M. (1995).** A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5: 61-73.

- Hilhorst, H.W.M., Smitt, A.I. y Karszen, C.M. (1986).** Gibberellin-biosynthesis and - sensitivity mediated stimulation of seed germination of *Sisymbrium officinale* by red light and nitrate. *Physiologia Plantarum*, 67: 285-290.
- Hills, P. N., y Van Staden, J. (2003).** Thermoinhibition of seed germination. *South African Journal of Botany*, 69(4), 455–461. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30281-7](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30281-7)
- Hoang, H. H., Sechet, J., Bailly, C., Leymarie, J., y Corbineau, F. (2014).** Inhibition of germination of dormant barley (*Hordeum vulgare* L.) grains by blue light as related to oxygen and hormonal regulation. *Plant, Cell and Environment*, 37(6), 1393–1403. <https://doi.org/10.1111/pce.12239>
- Holman, T.J., Jones, P.D., Russell, et al. (2009).** The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 4549–4554. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Huo, H., y Bradford, K. J. (2015).** Advances in Plant Dormancy. In *Advances in Plant Dormancy*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14451-1>
- Hussain, S., Brookbank, B. P., y Nambara, E. (2020).** Hydrolysis of abscisic acid glucose ester occurs locally and quickly in response to dehydration. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 1753–1756. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa026>
- International Seed Testing Association (ISTA) (2007).** Chapter 6: Tetrazolium test. In: *International Rules for Seed testing. Seed Science and Technology*. 6-10.
- International Seed Testing Association (ISTA). (1999).** *International Rules for Seed Testing. Rules*
- Jocković, J., Rajčević, N., Terzić, S., Zorić, L., Jocković, M., Miladinović, D., y Luković, J. (2020).** Pericarp features of wild perennial *Helianthus* L. species as a potential source for improvement of technical and technological properties of cultivated sunflower. *Industrial Crops and Products*, 144(October 2019), 112030. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112030>
- Johansen, D. A. 1940.** *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Johnson, B. L., y Dhaliwal, H. S. (1976).** Reproductive Isolation of *Triticum boeoticum* and *Triticum urartu* and the Origin of the Tetraploid Wheats. *American Journal of Botany*, 63(8), 1088. <https://doi.org/10.2307/2441653>
- Kang, J., Yim, S., Choi, H., Kim, A., Lee, K. P., Lopez-Molina, L., ... Lee, Y. (2015).** Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nature Communications*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms9113>
- Karszen, C.M., Zagorski, S., Kepczynski, J. y Groot, S.P.C. (1989).** Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany*, 63: 71- 80.
- Karszen C.M. (1982)** Seasonal patterns of dormancy in weed seeds. En: Khan A. (ed). *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. pp.243-270.
- Knowles, P.E. (1978).** Morphology and anatomy. In: Carter, J.F. (Ed.), *Sunflower Science and Technology*. ASA, Madison, pp. 55–88.
- Koornneef, M. (1981).** The complex syndrome of ttg mutants. *Arabidopsis Inf Serv* 18:45–51
- Koornneef, M. (1990).** Mutations affecting the testa colour in Arabidopsis. *Arabidopsis Inf Serv* 27:1–4
- Labuza, T. P. (1980).** The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technology*, 34, 36-41,59.
- Lachabrouilli, A. S., Rigal, K., Corbineau, F., y Bailly, C. (2021).** Effects of agroclimatic conditions on sunflower seed dormancy at harvest. *European Journal of Agronomy*, 124, 126209. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126209>
- Lan, X. J., Wei, Y. M., Liu, D. C., Yan, Z. H., y Zheng, Y. L. (2005).** Inheritance of seed dormancy in Tibetan semi-wild wheat accession Q1028. *Journal of Applied Genetics*, 46(2), 133–138.

- Le Page-Degivry MT, Bianco J, Barthe P and Garello G (1996).** Changes in hormone sensitivity in relation to onset and breaking of sunflower embryo dormancy, pp. 221–231 in Lang GA (ed), *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Wallingford, UK: CAB International.
- Le Page-Degivry, M. T. y Garello, G. (1992).** *In situ* abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology* 98: 1386-1390.
- Le Page-Degivry, M. T., Barthe, P. y Garello, G. (1990).** Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus*. *Plant Physiology* 92: 1164-1168.
- Lee, K. J. D., Dekkers, B. J. W., Steinbrecher, T., Walsh, C. T., Bacic, A., Bentsink, L., ... Knox, J. P. (2012).** Distinct Cell Wall Architectures in Seed Endosperms in Representatives of the Brassicaceae and Solanaceae. *Plant Physiology*, 160(3), 1551–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203661>
- Lee KP, Piskurewicz U, Turecková V, Strnad M, y Lopez-Molina L (2010).** A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in Arabidopsis dormant seeds. *PNAS* 107(44):19108-19113.
- Lee P-C, Taylor AG, Zhang M, Esashi Y. (2000) ^a.** Volatile compounds and accumulation of acetaldehyde-protein adducts in relation to seed quality and storage conditions. *Journal of New Seeds* 2, 59–76.
- Lee P-C, Taylor AG, Zhang M, Esashi Y. (2000) ^b.** Evolution of volatiles during seed ageing: exogenous gas application. *Journal of New Seeds* 2, 77–91.
- Lenoir, C., Corbineau, F. y Côme, D. (1986).** Barley (*Hordeum vulgare*) seed dormancy as related to glumella characteristics. *Physiol Plantarum* 68, 301–307.
- Leopold, A. C., Glenister, R., y Cohn, M. A. (1988).** Relationship between water content and afterripening in red rice. *Physiologia Plantarum*, 74(4), 659–662. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb02032.x>
- Leopold, A. C., y Vertucci, C. W. (1989).** Moisture as a Regulator of Physiological Reaction in Seeds. (14), 51–67. <https://doi.org/10.2135/cssaspecpub14.c4>
- Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., y Xu, H. E. (2014).** Abscisic acid perception and signaling: Structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(5), 567–584. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.5>
- Lindström, L.I., Pellegrini, C.N., y Hernández, L.F. (2000).** Anatomía y desarrollo del pericarpio de distintos genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L.). In *The 15th International Sunflower Conference, Proceedings*, Toulouse, France. pp. D13–D18.
- Lindström, L. I., Pellegrini, C. N., y Hernández, L. F. (2007).** Histological development of the sunflower fruit pericarp as affected by pre- and early post-anthesis canopy shading. *Field Crops Research*, 103(3), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.06.005>
- Lindström, L. I., y Hernández, L. F. (2015).** Developmental morphology and anatomy of the reproductive structures in sunflower (*Helianthus annuus*): a unified temporal scale. *Botany*, 93(5), 307–316. <https://doi.org/10.1139/cjb-2014-0245>
- López, F. B., y Barclay, G. F. (2017).** Plant Anatomy and Physiology. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00004-4>
- Lunn Major, B.J., Kettlewell, P.S. y R.K. Scott (2001).** Mechanisms leading to excess Alpha-Amylase Activity in Wheat (*Triticum aestivum* L) Grain in the UK. *Journal of Cereal Science*. 33:313-329
- MacGregor D.R., Kendall S.L., Florance H., Fedi F., Moore K., Paszkiewicz K., Smirnov N. y Penfield S. (2015).** Seed production temperature regulation of primary dormancy occurs through control of seed coat phenylpropanoid metabolism. *New Phytologist* (2015) 205: 642–652.
- Maiti, R.K. Vidyasagar P., Shahapur S. C. y Seiler G. J. (2006).** Studies on genotypic variability and seed dormancy in sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) *Indian J. Crop Science*, 1(1-2): 84-87.
- Makkar, H. P. S. (2002).** Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. *Kluwer Academic publishers. Viena, Austria*, pp: 49–99.
- Malavert, C., Batlla, D., y Benech-Arnold, R. L. (2020).** The role of seed water content for the perception of temperature signals that drive dormancy changes in *Polygonum aviculare* buried seeds. *Functional Plant Biology*. <https://doi.org/10.1071/FP20011>

- Mantese, A. I., Medan, D., y Hall, A. J. (2006).** Achene structure, development and lipid accumulation in sunflower cultivars differing in oil content at maturity. *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution*, 97(6), 999–1010. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl046>
- Marzinek, J., De-Paula, O. C., y Oliveira, D. M. T. (2008).** Cypselas or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. *Revista Brasileira de Botânica*, 31(3), 549–553. <https://doi.org/10.1590/s0100-84042008000300018>
- Meimoun, P., Mordret, E., Langlade, N. B., Balzergue, S., Arribat, S., Bailly, C., y El-Maarouf-Bouteau, H. (2014).** Is gene transcription involved in seed dry after-ripening? *PLoS ONE*, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086442>
- Mendondo, G. M., Gibbs, D. J., Szurman-Zubrzycka, M., Korn, A., Marquez, J., Szarejko, I., ... Holdsworth, M. J. (2015).** Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1), 40–50. <https://doi.org/10.1111/pbi.12334>
- Michalak, M., Barciszewska, M. Z., Barciszewski, J., Plitta, B. P., y Chmielarz, P. (2013).** Global Changes in DNA Methylation in Seeds and Seedlings of *Pyrus communis* after Seed Desiccation and Storage. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070693>
- Miko, I. (2008).** Genetic dominance: genotype-phenotype relationships. *Nature Education* 1(1):140
- Mira, S., González-Benito, M. E., Hill, L. M., y Walters, C. (2010).** Characterization of volatile production during storage of lettuce (*Lactuca sativa*) seed. *Journal of Experimental Botany*, 61(14), 3915–3924. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq202>
- Mira, S., Hill, L. M., González-Benito, M. E., Ibáñez, M. A., y Walters, C. (2016).** Volatile emission in dry seeds as a way to probe chemical reactions during initial asymptomatic deterioration. *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1783–1793. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv568>
- Morscher, F., Kranner, I., Arc, E., Bailly, C., y Roach, T. (2015).** Glutathione redox state, tocochromanols, fatty acids, antioxidant enzymes and protein carbonylation in sunflower seed embryos associated with after-ripening and ageing. *Annals of Botany*, 116(4), 669–678. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv108>
- Motulsky, HJ. (2003).** GraphPad Prism Statistics Guide-Statistical Analyses for Laboratory and Clinical Researchers. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA. www.graphpad.com
- Müller, K., Tintelnot, S., y Leubner-Metzger, G. (2006).** Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: Abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(7), 864–877. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj059>
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., y Kamiya, Y. (2010).** Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, 20(2), 55–67. <https://doi.org/10.1017/S0960258510000012>
- Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F y Bailly C (2007)** ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal* (2007) 50, 452–465
- Pace, B. A., Alexander, H. M., Emry, J. D., y Mercer, K. L. (2015).** Seed fates in crop-wild hybrid sunflower: Crop allele and maternal effects. *Evolutionary Applications*, 8(2), 121–132. <https://doi.org/10.1111/eva.12236>
- Pandey, A.K., and Dhakal, M.R. (2001).** Phytomelanin in Compositae. *Curr Sci.* 80: 933-940
- Penfield, S., y MacGregor, D. R. (2017).** Effects of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany*, 68(4), 819–825. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw436>
- Pixton, S. W., y Warburton, S. (1971).** Moisture Content Relative Humidity Equilibrium, at Different Temperatures, of some Oilseeds of Economic Importance. *In Prod. Res* (Vol. 7). Pergamon Press.
- Pizzorno L. (2021).** El efecto de fotoperiodo y la radiación sobre el nivel de dormición a cosecha de frutos de girasol (*Helianthus annuus*): el rol de las cubiertas del fruto. Magíster en Producción Vegetal. EPG-FAUBA.

- Pizzorno, L., Batlla D. y M. López Pereira (2012).** Maternal environment effects on sunflower achene dormancy level: photoperiod and incident radiation. Proceedings of the 11th Conference of the International Society for Seed Science, Changsha, China. P. 98.
- Presotto, A., Hernández, F., Casquero, M., Vercellino, R., Pandolfo, C., Poverene, M., y Cantamutto, M. (2020).** Seed bank dynamics of an invasive alien species, *Helianthus annuus* L. *Journal of Plant Ecology*, 1–40. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtaa016>
- Presotto A., Poverene M., Cantamutto M. (2014)** Seed dormancy and hybridization effect of the invasive species, *Helianthus annuus*. *Annals of Applied Biology*, **164**, 373–383.
- Probert RJ (2000)** The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination, pp. 261–292 in Fenner M (ed), *Seeds – the Ecology of Regeneration in Plant Communities*. Wallingford, UK: CAB International.
- R Core Team (2017).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Radanovic, A., Miladinovic, D., Cvejic, S., Jockovic, M., y Joci, S.(2018).** Sunflower Genetics from Ancestors to Modern. *Genes*, 9, 528. <https://doi.org/10.3390/genes9110528>
- Ritland, K. (1983).** The joint evolution of seed dormancy and flowering time in annual plants living in variable environments. *Theoretical Population Biology*, 24(3), 213–243. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(83\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0040-5809(83)90026-6)
- Riveira-Rubin, M., Arata, G. J., López, E. D., Rodríguez, M. V., y Batlla, D. (2021).** Dormancy attributes in sunflower achenes (*Helianthus annuus* L.): II. Sowing date effects. *Crop Science*, (February), 1–16. <https://doi.org/10.1002/csc2.20612>
- Roach, D. A., and R. D. Wulff 1987.** Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:209–235 .
- Roach, D. A., y Wulff, R. D. (1987).** Maternal Effects in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 209–235. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001233>
- Rodríguez, M. V., Arata, G. J., Díaz, S. M., Rentería, S., y Benech-Arnold, R. L. (2021).** Phenotyping for resistance to pre-harvest sprouting in grain sorghum. *Seed Science Research*, 31(3), 178–187. <https://doi.org/10.1017/S0960258521000076>
- Rodríguez M.V., Barrero J., Corbineau F., Gubler F. and Benech-Arnold R.L. (2015).** Dormancy in Cereals (not too much, not so little): About the mechanisms behind this trait. *Seed Science Research*. DOI: 10.1017/S0960258515000021
- Rodríguez M.V., Bodrone M.P., Castellari M.P. y Batlla D. (2018).** Effect of storage temperature on dormancy release of sunflower (*Helianthus annuus*) achenes. *Seed Science Research*. <https://doi.org/10.1017/S0960258518000065>.
- Rodríguez MV.,Toorop, P. y Benech-Arnold, R. (2012).** Challenges Facing Seed Banks and Agriculture in Relation to Seed Quality. En: “Methods in Molecular Biology: Seed Dormancy”. Ed.: Allison Kermode. Springer-Apress, NY, USA.
- Rodríguez, M.V., Rondanini D., Libenson S. y R.A. Sánchez (2003).** Efectos contrastantes de altas temperaturas durante todo o parte del período de crecimiento de los frutos sobre la germinación en girasol. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica & XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile. 19-21 de octubre de 2003. San Luis, Argentina. Boletín de la SAB 38: 195.
- Rodríguez, M. V., Mendiondo, G. M., Cantoro, R., Auge, G. A., Luna, V., Masciarelli, O., y Benech-Arnold, R. L. (2012).** Expression of seed dormancy in grain sorghum lines with contrasting pre-harvest sprouting behavior involves differential regulation of gibberellin metabolism genes. *Plant and Cell Physiology*, 53(1), 64–80. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr154>
- Rolletschek H, Stangelmayer A y Borisjuk L (2009).** Methodology and Significance of Microsensor-based Oxygen Mapping in Plant Seeds – an Overview. *Sensors*, 9, 3218–3227.
- Rolletschek, H., Borisjuk, L., Sánchez-García, et al. (2007).** Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3171–3181.

- Rondanini, D. P., Savin, R., y Hall, A. J. (2007).** Estimation of physiological maturity in sunflower as a function of fruit water concentration. *European Journal of Agronomy*, 26(3), 295–309. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.11.001>
- Roth, I. (1977).** Fruits of angiosperms. *Encyclopedia of plant anatomy*. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- Seiler G. (1998)** Seed Maturity, Storage Time and Temperature, and Media Treatment Effects on Germination of Two Wild Sunflowers. *Agronomy Journal*. 90:221-226 (1998).
- Seiler GJ (1997).** Anatomy and morphology of sunflower, pp. 67–111 in Schneiter AA (ed), *Sunflower Technology and Production*. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.
- Singh, J., Clavijo Michelangeli, J. A., Gezan, S. A., Lee, H., y Vallejos, C. E. (2017).** Maternal effects on seed and seedling phenotypes in reciprocal F1hybrids of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, 8(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00042>
- Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A., y Szarejko, I. (2016).** The role and regulation of ABI5 (ABA-insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01884>
- Smith, B. D. (2006).** Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12223–12228. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604335103>
- Steadman KJ, Bignell GP and Ellery AJ (2003a)** Field assessment of thermal after-ripening time for dormancy release prediction in *Lolium rigidum* seeds. *Weed Research* 43, 458–465.
- Steadman KJ, Crawford AD and Gallagher RS (2003b)** Dormancy release in *Lolium rigidum* seeds is a function of thermal after-ripening time and seed water content. *Functional Plant Biology* 30, 345–352.
- Steinbach HS, Benech-Arnold RL, Kristof G, Sanchez RA, y Marcucci-Poltri S. (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.
- Subrahmanyam, S. V. R., Kumar, S. S. R., y Ranganatha, A. R. G. (2002).** Genotypic differences for seed dormancy in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Seed Research (New Delhi)*, 30, 325–327.
- Sung, Y., Cantliffe, D. J., Nagata, R. T., y Nascimento, W. M. (2008).** Structural Changes in Lettuce Seed During Germination at High Temperature Altered by Genotype, Seed Maturation Temperature, and Seed Priming. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(2), 300–311. <https://doi.org/10.21273/jashs.133.2.300>
- Szemruch, C., Del Longo, O., Ferrari, L., Renteria, S., Murcia, M., Cantamutto, M., y Rondanini, D. (2015).** Ranges of Vigor Based on the Electrical Conductivity Test in Dehulled Sunflower Seeds. *Research Journal of Seed Science*, 8(1), 12–21. <https://doi.org/10.3923/rjss.2015.12.21>
- Tamura, N., Yoshida, T., Tanaka, A., Sasaki, R., Bando, A., Toh, S., ... Kawakami, N. (2006).** Isolation and characterization of high temperature-resistant germination mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(8), 1081–1094. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj078>
- Vegis, A. (1964).** Dormancy in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 15, 185–224. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp>.
- Vertucci C, Vertucci F y Leopold A (1987).** Water content and the conversion of phytochrome regulation of lettuce dormancy. *Plant Physiology*, 84: 887-890.
- Vertucci, C. W., y Leopold, A. C. (1984).** Bound water in soybean seed and its relation to respiration and imbibitional damage. *Plant Physiol* 75: 114-117
- Vertucci, C. W., y Leopold, A. C. (1986).** Physiological activities associated with hydration level in seeds. In AC Leopold, ed, *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. Cornell University Press, Ithaca, NY, PP 35-49

- Vertucci, C. W., y Leopold, A. C. (1987).** Water binding in legume seeds. *Plant Physiology*, 85, 224–231. <https://doi.org/10.1104/pp.85.1.224>
- Vertucci, C. W., y Roos, E. E. (1990).** Theoretical Basis of Protocols for Seed Storage. *Plant Physiology*, 94(3), 1019–1023. <https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1019>
- Vertucci, C. W., y Roos, E. E. (1993).** Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research*, 3(3), 201–213. <https://doi.org/10.1017/s0960258500001793>
- Vigliocco, A., Del Bel, Z., Pérez-Chaca, M.V., Molina, A., Zirulnik, F., Andrade, A.M. y Alemano S. (2020).** Spatiotemporal variations in salicylic acid and hydrogen peroxide in sunflower seeds during transition from dormancy to germination. *Physiologia Plantarum* 169: 27–39. doi:10.1111/ppl.13043
- Vujaković, M., Radić, V., Miklič, V. Jovičić, D., Balešević-Tubić, S., Mr̄da, J., y Škorić, D. (2012).** Seed dormancy of hybrids and parent lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 35(56), 111–118. <https://doi.org/10.2298/HEL1256111V>
- Walker-Simmons, M. (1987).** ABA Levels and Sensitivity in Developing Wheat Embryos of Sprouting Resistant and Susceptible Cultivars. *Plant Physiology*, 84(1), 61–66. <https://doi.org/10.1104/pp.84.1.61>
- Walker-Simmons, M. (1988).** Enhancement of ABA responsiveness in wheat embryos by high temperature. *Plant, Cell y Environment*, 11(8), 769–775. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1988.tb01161.x>
- Walters C, Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P (2002).** In: Black M, Pritchard HW, eds. *Desiccation and Survival in Plants. Drying without Dying*. Wallingford: CABI, pp 263–291 (Hydration levels, desiccation stress and damage)
- Walters, C. (1998).** Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research*, 8(2), 223–244. <https://doi.org/10.1017/s096025850000413x>
- Walters, C., Landré, P., Hill, L., Corbineau, F., y Bailly, C. (2005).** Organization of lipid reserves in cotyledons of primed and aged sunflower seeds. *Planta*, 222(3), 397–407. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1541-5>
- Wang, X., Yesbergenova-Cuny, Z., Biniek, C., Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., y Corbineau, F. (2018).** Revisiting the role of ethylene and N-end rule pathway on chilling-induced dormancy release in arabidopsis seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113577>
- Washitani, I. (1987).** A convenient screening test system and a model for thermal germination responses of wild plant seeds: Behaviour of model and real seeds in the system. *Plant, Cell y Environment*, 10(7), 587–598. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11604111>
- Weiss A.N., Primer S.B., Pace B.A., Mercer K.L. (2013)** Maternal effects and embryo genetics: germination and dormancy of crop–wild sunflower hybrids. *Seed Science Research*, 23, 241–255
- Wilcox, D., Done, A., McDavid, P. and Greer, P. (2002).** Image Tool v. 3.0, University of Texas, Health Science Center, San Antonio, TX.
- Wills, D. M., y Burke, J. M. (2007).** Quantitative trait locus analysis of the early domestication of sunflower. *Genetics*, 176(4), 2589–2599. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.075333>
- Wolf, J. B., y Wade, M. J. (2009).** What are maternal effects (and what are they not)? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1520), 1107–1115. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0238>
- Xia, Q., Ponnaiah, M., Thanikathansubramanian, K., Corbineau, F., Bailly, C., Nambara, E., ... El-Maarouf-Bouteau, H. (2019).** Re-localization of hormone effectors is associated with dormancy alleviation by temperature and after-ripening in sunflower seeds. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40494-w>
- Yazdanpanah, F., Hanson, J., Hilhorst, H. W. M., y Bentsink, L. (2017).** Differentially expressed genes during the imbibition of dormant and after-ripened seeds - a reverse genetics approach. *BMC Plant Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1098-z>

Zhang, M., Yoshiyama, M., Nagashima, T., y Nakagawa, Y. (1995). Aging of Soybean Seeds in Relation to Metabolism at Different Relative Humidities. *Plant and Cell Physiology*, 36(7), 1189–1195. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078875>

ANEXO



Imagen S. 2. 1. Imágenes de aquenios de los diferentes genotipos estudiados en este trabajo. Se muestra el aquenio entero y en corte longitudinal. Las imágenes se obtuvieron a través de una lupa (10x) con una cámara digital incorporada.

Cuadro S. 2.1. Fenología y ambiente explorado en los diferentes experimentos (1, 2 y 3). En cada genotipo, se determinó la fecha media de antesis (R5.5), madurez de cosecha, los días entre siembra a antesis y antesis a madurez de cosecha. En esta última etapa (llenado del aquenio y posterior secado) se detallaron las variables climáticas.

Geno tipo	Fecha/			Duración					TMD (°C)	TMma x (°C)	TMmin (°C)	TmaxA (°C)	TminA (°C)	PRMD (MJ/m ²)	RMDA (MJ/m ²)	
	R5.5	MF	MC	S- R5. 5	R5.5 - MF	R5.5 - MC	MF- MC	DLL (TT)								
Experimento I - 2015/2016: Fecha de siembra 17/9/2015																
1579	23/1 2/15	18/1 /16	16/2 /16	97	26	55	29	522	25,5 ± 2	30,7 ± 2,3	20,9 ± 2,4	36,7	14,6	17,9	641,9	
1673	17/1 2/15	ND	9/2/ 16	91	ND	54	ND	ND	25 ± 2,1	30,0 ± 2,6	20,5 ± 2,5	36,7	11,4	19,0	ND	
600	18/1 2/15	18/1 /16	2/3/ 16	92	31	75	44	602	24,9 ± 2,4	29,9 ± 2,9	20,2 ± 2,7	36,7	10,2	16,0	772,1	
HA89	22/1 2/15	24/1 /16	5/3/ 16	96	33	74	41	640	25 ± 2,4	30,0 ± 2,9	20,3 ± 2,6	36,7	10,1	15,3	796,7	
1552	7/12/ 15	ND	18/2 /16	81	ND	73	ND	ND	24,9 ± 2,2	30,0 ± 2,5	20,1 ± 2,6	36,7	11,4	18,7	ND	
609	13/1 2/15	16/1 /16	18/2 /16	87	34	67	33	633	25,2 ± 2,1	30,3 ± 2,5	20,5 ± 2,5	36,7	11,4	18,0	841,0	
BAR	31/1 2/15	ND	12/2 /16	105	ND	43	ND	ND	25,3 ± 2	30,5 ± 2,4	20,8 ± 2,4	36,7	11,4	17,7	ND	
LMA	11/1/ 16	ND	16/2 /16	116	ND	36	ND	ND	25,7 ± 2	31,2 ± 2,4	20,9 ± 2,3	36,7	11,4	15,9	ND	
AAL	5/1/1 6	29/1 /16	12/2 /16	110	24	38	14	457	25,3 ± 2,1	30,7 ± 2,5	20,5 ± 2,5	36,7	11,4	18,3	602,8	
<u>Mean</u>	<u>21/1</u> <u>2/15</u>	<u>19/1</u> <u>/16</u>	<u>19/2</u> <u>/16</u>	<u>95,6</u>	<u>31,0</u>	<u>59,6</u>	<u>36,8</u>	-	<u>25,1</u>	<u>30,4</u>	<u>20,5</u>	<u>36,7</u>	<u>11,5</u>	<u>17,3</u>	<u>762,9</u>	
Experimento II - 2016/2017: Fecha de siembra 25/8/2017																

601	2/12/ 16	ND	13/1 /17	99	ND	42	ND	ND	24,6 ± 2,5	30,3 ± 2,7	±	19 ± 3,4	34,8	12,6	20,7	ND
587	3/12/ 16	ND	13/1 /17	100	ND	41	ND	ND	24,6 ± 2,5	30,2 ± 2,7	±	19,1 ± 3,4	34,8	12,6	20,5	ND
608	4/12/ 16	ND	13/1 /17	101	ND	40	ND	ND	24,6 ± 2,6	30,2 ± 2,7	±	19,0 ± 3,4	34,8	12,6	20,4	ND
609	30/1 1/16	3/1/ 17	13/1 /17	97	34	44	10	646	24,6 ± 2,5	30,2 ± 2,7	±	19,0 ± 3,3	34,8	12,6	20,6	833,9
B91	26/1 1/16	ND	13/1 /17	93	ND	48	ND	ND	24,6 ± 2,5	29,9 ± 2,7	±	18,9 ± 3,2	34,8	12,6	20,6	ND
600	6/12/ 16	7/1/ 17	21/1 /17	103	32	46	14	609	24,6 ± 2,6	30,1 ± 2,8	±	19,4 ± 3,4	34,8	12,6	19,3	781,6
HA34 2	6/12/ 16	10/1 /17	21/1 /17	103	35	46	11	661	24,6 ± 2,6	30,1 ± 2,8	±	19,4 ± 3,4	34,8	12,6	19,3	845,2
1575	11/1 2/16	ND	24/1 /17	108	ND	44	ND	ND	24,6 ± 2,5	30,3 ± 2,7	±	20,1 ± 3,2	34,8	12,6	18,9	ND
HA89	12/1 2/16	14/1 /17	27/1 /17	109	33	46	13	637	24,6 ± 2,8	30,0 ± 3,6	±	19,7 ± 3,6	34,8	11,9	18,5	764,5
B123	10/1 2/16	ND	27/1 /17	107	ND	48	ND	ND	24,6 ± 2,7	30,0 ± 3,6	±	19,6 ± 3,6	34,8	11,9	18,8	ND
581	10/1 2/16	ND	27/1 /17	107	ND	48	ND	ND	24,6 ± 2,7	30,0 ± 3,6	±	19,6 ± 3,6	34,8	11,9	18,8	ND
1679	8/12/ 16	ND	21/1 /17	105	ND	44	ND	ND	24,4 ± 2,6	30,1 ± 3,4	±	19,6 ± 3,4	34,8	12,6	19,1	ND
591	5/12/ 16	ND	21/1 /17	102	ND	47	ND	ND	24,4 ± 2,6	30,2 ± 3,4	±	19,3 ± 3,4	34,8	12,6	19,4	ND
561	9/12/ 16	ND	24/1 /17	106	ND	46	ND	ND	25,4 ± 2,5	30,3 ± 3,4	±	19,8 ± 3,4	34,8	12,6	19,1	ND
GOR	20/1 2/16	ND	16/2 /17	117	ND	58	ND	ND	24,3 ± 2,8	29,5 ± 3,3	±	19,7 ± 3,3	35,6	10,7	17,2	ND

1579	10/1 2/16	6/1/ 17	24/1 /17	107	27	45	18	524	25,3 ± 2,5	30,3 ± 3,3	19,9 ± 3,3	± 34,8	12,6	19,1	641,9
<u>Mean</u>	<u>7/12/</u> <u>16</u>	<u>8/1/</u> <u>17</u>	<u>21/1</u> <u>/17</u>	<u>104,</u> <u>0</u>	<u>32,2</u>	<u>45,8</u>	<u>13,2</u>	-	<u>24,7</u>	<u>30,1</u>	<u>19,4</u>	<u>34,9</u>	<u>12,4</u>	<u>19,4</u>	<u>773,4</u>

Experimento III - 2016/2017: Fecha de siembra 26/9/2016

600	15/1 2/16	15/1 /17	31/1 /17	81	31	46	16	605	25,2 ± 2,7	30,1 ± 2,9	20,3 ± 3,4	± 34,3	8,8	18,2	691,1
HA89	19/1 2/16	20/1 /17	31/1 /17	84	32	43	10	632	25,1 ± 2,6	30,2 ± 2,8	20,1 ± 3,4	± 34,3	8,8	18,3	720,1
1579	26/1 2/16	21/1 /17	7/2/ 17	91	26	43	17	528	24,8 ± 3,0	29,7 ± 3,1	19,8 ± 3,7	± 34,3	8,8	17,6	598,2
AAL	2/1/1 7	25/1 /17	8/2/ 17	98	24	37	13	461	24,4 ± 2,9	29,4 ± 3,1	19,2 ± 3,5	± 34,3	8,8	18,0	526,4
<u>Mean</u>	<u>23/1</u> <u>2/16</u>	<u>20/1</u> <u>/17</u>	<u>3/2/</u> <u>17</u>	<u>88,6</u>	<u>28,1</u>	<u>42,2</u>	<u>14,1</u>	-	<u>24,9</u>	<u>29,9</u>	<u>19,9</u>	<u>34,3</u>	<u>8,8</u>	<u>18,0</u>	<u>633,9</u>

R5.5: Antesis; **MF:** Madurez fisiológica; **MC:** madurez de cosecha; **S-R5.5:** Duración en días de la etapa siembra-R5.5; **R5.5-MF:** duración en días de la etapa R5.5-Madurez fisiológica; **R5.5-MC:** Duración en días de la etapa R5.5-MC;

MF-MC: tiempo de secado a campo; **DLL (TT):** Duración de la fase de llenado en tiempo térmico (°C.día); **TMD: temperatura media diaria entre R5.5-MC;** **TMmax:** temperatura media diaria máxima entre R5-MC; **TMmin:** T° media diaria mínima entre R5-MC;

TmaxA: Temperatura máxima absoluta entre R5.5-MC; **TminA:** temperatura mínima absoluta entre R5.5-MC; **PMRD (Mj/m2):** promedio de la radiación media diaria entre R5.5-MC; **RMDA (Mj/m2):** Radiación media diaria acumulada entre R5-PM

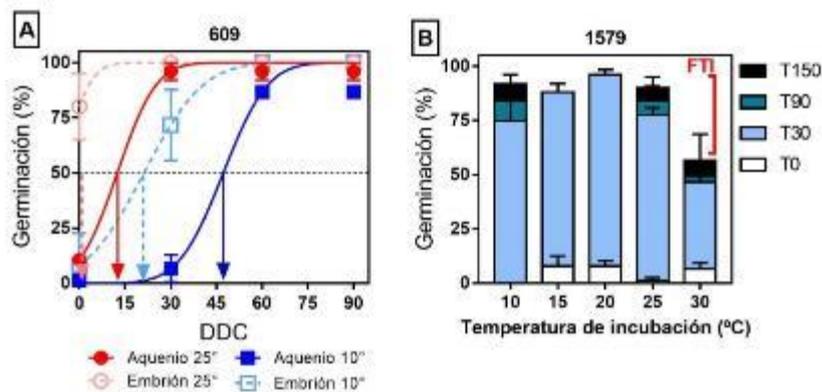


Fig. S. 2. 1. (A) Germinación final (%) para el genotipo 609 (línea endogámica) en diferentes momentos durante almacenaje (DDC) para aquenios (círculos llenos y línea roja) y embriones (cuadrados vacíos y líneas rosas punteadas) a 25°C, y aquenios (círculos llenos y línea azul) y embriones a 10°C (cuadrados vacíos y líneas azul claro punteadas). Las flechas indican el momento durante la postcosecha en alcanzar el 50% de germinación final (T₅₀). (B) Germinación final acumulada (%) en función del rango térmico de incubación (10-30°C) a cosecha (0 DDC, barras blancas), y durante la postcosecha: 30 (barras celestes), 90 (barras azules) y 150 DDC (barras negras). El corchete color rojo representa el factor de termo inhibición (FTI) para este genotipo, observado como una disminución de la germinación final a 30°C en comparación con el valor máximo de germinación alcanzado a temperaturas de incubación más bajas (10° y 25°C en el *experimento 1* y *2* respectivamente).

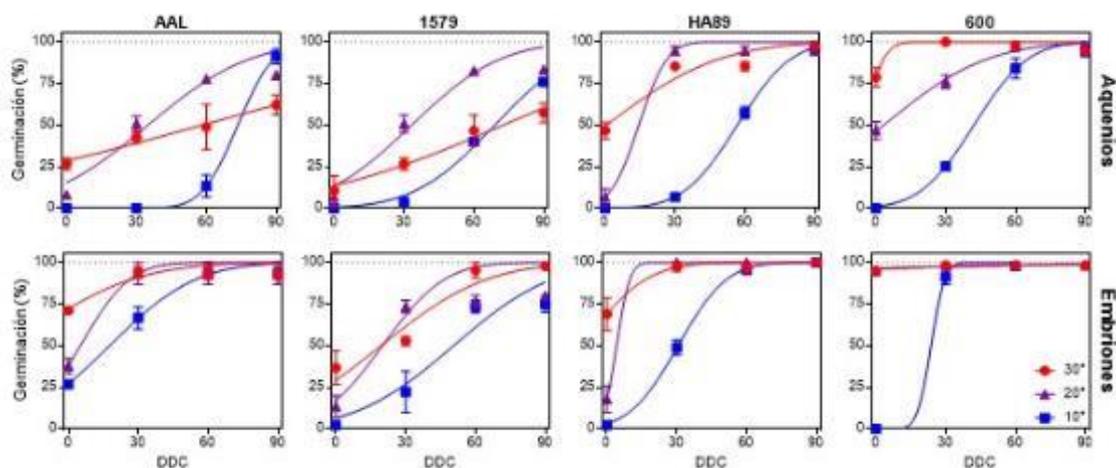


Fig. S. 2. 2. Germinación final de aquenios (fila superior) y embriones (fila inferior) incubados a 10° (cuadrados y líneas azules), 20° (triángulos y líneas violetas) y 30°C (círculos y líneas rojas), a cosecha (0 DDC) y durante la postcosecha (30, 60 y 90 DDC). Se muestran los diferentes genotipos probados en el experimento 3 (en columnas AAL, 1579, HA89 y 600). Cada punto representa la media ± EE (n=3).

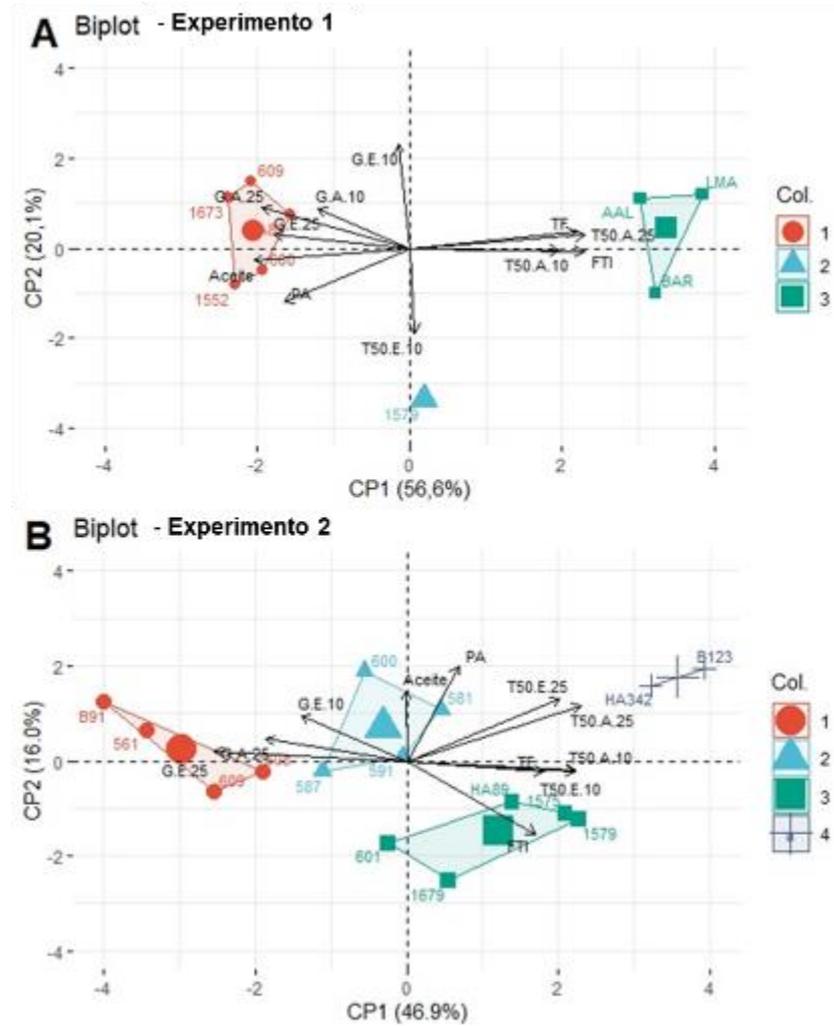


Fig. S. 2. 3. Componentes principales de las variables de germinación, contenido de aceite (Aceite), peso de aquenio (PA) y tiempo a floración (TF) en diferentes genotipos estudiados en el experimento 1 (A) y 2 (B). Cada punto representa un genotipo y los diferentes colores a través de grupos asignados a través del análisis de clúster (excluyendo del análisis el genotipo GOR). Los autovectores desde el origen (flechas negras) representan las variables de estudio.

Cuadro S. 3. 1. Fenología y ambiente explorado en los diferentes experimentos (4 y 5). En cada genotipo (tanto parentales como cruza) se determinó la fecha media de antesis (R5.5), madurez de cosecha, los días entre siembra a antesis y antesis a madurez de cosecha. En esta última etapa (llenado del aquenio y posterior secado) se detallaron las variables climáticas.

Geno tipo	Siem bra	Fecha/ Fase en días								TMD (°C)	TMmax (°C)	TMmin (°C)	TmaxA (°C)	TminA (°C)	PRMD (MJ/m ²)	RMDA (MJ/m ²)
		R5.5	MF	MC	S- R5. 5	R5.5 - MF	R5.5 - MC	MF- MC	DLL (TT)							
Experimento 4: 2017/2018																
HA342	10/1 0/17	25/1 2/17	27/1 /18	16/2 /18	76	33	53	20	660,1	25,3 ± 3,1	31,0 ± 3,7	19,8 ± 3,4	37,2	11,7	25,9 ± 6,6	853,1
HA342 x609	10/1 0/17	23/1 2/17	25/1 /18	16/2 /18	74	33	55	22	672,7	25,1 ± 3,0	30,8 ± 3,7	19,6 ± 3,01	37,2	11,7	25,9 ± 6,6	850,9
1579	10/1 0/17	31/1 2/17	29/1 /18	16/2 /18	82	29	47	23	528,6	25,0 ± 3,1	30,6 ± 3,7	19,6 ± 3,4	37,2	11,7	25,6 ± 6,9	576,3
1579x6 09	10/1 0/17	29/1 2/17	27/1 /18	16/2 /18	80	29	49	25	591,4	25,1 ± 3,2	30,8 ± 3,8	19,7 ± 3,4	37,2	11,7	25,8 ± 6,7	561,9
B123	18/1 0/17	27/1 2/17	29/1 /18	16/2 /18	70	33	51	18	657,4	25,2 ± 3,2	30,9 ± 3,8	19,8 ± 3,3	37,2	11,7	25,8 ± 6,6	855,6
B123x 609	18/1 0/17	27/1 2/17	29/1 /18	16/2 /18	70	33	51	18	596,8	25,2 ± 3,2	30,9 ± 3,8	19,8 ± 3,3	37,2	11,7	25,8 ±6,6	855,6
609	18/1 0/17	25/1 2/17	26/1 /18	16/2 /18	68	32	53	21	641,0	25,3 ± 3,1	31,0 ± 3,8	19,7 ± 3,4	37,2	11,7	25,9 ± 6,6	832,4
609x15 79	18/1 0/17	26/1 2/17	27/1 /18	16/2 /18	69	32	52	20	641,3	25,3 ± 3,1	31,0 ± 3,7	19,9 ± 3,4	37,2	11,7	25,8 ± 6,6	821,6
609xH A342	18/1 0/17	21/1 2/17	22/1 /18	16/2 /18	64	32	57	25	641,9	25,1 ± 3,2	30,8 ± 3,8	19,7 ± 3,5	37,2	11,7	25,8 ± 6,6	819,6
609xB 123	18/1 0/17	28/1 2/17	29/1 /18	16/2 /18	71	32	50	18	636,8	25,2 ± 3,2	30,9 ± 3,8	19,7 ± 3,4	37,2	11,7	25,9 ± 6,7	831,4

Media	14/1	26/1	25/1	16/2						25,2 ±	30,9 ±	19,7 ±	37,2 ±	11,7 ±	25,8 ±	785,8 ±
± DE	0/17	2/17	/18	/18	72	31	52	21	626,8	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	115,1
Experimento 5: 2018/2019																
	23/1	29/1/	28/2	15/3						22,9 ±	27,8 ±	17,9 ±			21,5 ±	
HA342	1/18	19	/19	/19	67	30	45	15	549,7	3,7	4,3	3,7	35,6	10,5	6,4	692,4
HA342	23/1	29/1/	28/2	15/3						22,9 ±	27,8 ±	17,9 ±			21,5 ±	
x609	1/18	19	/19	/19	67	30	45	15	549,7	3,7	4,3	3,7	35,6	10,5	6,4	692,4
	15/1	30/1/	24/2	11/3						23,0	28,0 ±	17,8 ±			21,8 ±	
1579	1/18	19	/19	/19	76	25	40	15	421,5	± 3,7	4,1	3,8	35,6	10,5	6,0	544,5
1579x6	15/1	30/1/	24/2	11/3						23,0 ±	28,0 ±	17,8 ±			21,8 ±	
09	1/18	19	/19	/19	76	25	40	15	421,5	3,7	4,1	3,8	35,6	10,5	6,0	544,5
	29/1	5/2/1	6/3/	25/3						21,8 ±	26,8 ±	17,0 ±			20,1 ±	
609	1/18	9	19	/19	68	29	48	19	534,0	3,9	4,4	4,0	35,6	10,3	6,2	679,0
609xH	29/1	6/2/1	7/3/	25/3						21,7 ±	26,7 ±	16,9 ±			19,8 ±	
A342	1/18	9	19	/19	69	29	47	18	522,2	4,0	4,5	4,0	35,6	10,3	6,1	640,5
609x15	29/1	6/2/1	7/3/	25/3						21,7 ±	26,7 ±	16,9 ±			19,8 ±	
79	1/18	9	19	/19	69	29	47	18	522,2	4,0	4,5	4,0	35,6	10,3	6,1	640,5
Media	23/1	1/2/1	1/3/	18/3						22,4 ±	27,4 ±	17,5 ±	35,6 ±	10,4 ±	20,8 ±	633,4 ±
± DE	1/18	9	19	/19	70	28	45	16	503,0	0,7	0,7	0,5	0	0	0,9	64,5

R5.5: Antesis; **MF:** Madurez fisiológica; **MC:** madurez de cosecha; **S-R5.5:** Duración en días de la etapa siembra-R5.5; **R5.5-MF:** duración en días de la etapa R5.5-Madurez fisiológica;

R5.5-MC: Duración en días de la etapa R5.5-MC; **MF-MC:** tiempo de secado a campo; **DLL (TT):** Duración de la fase de llenado en tiempo térmico (°C.día); **TMD:** temperatura media diaria entre R5.5-MC;

TMmax: temperatura media diaria máxima entre R5-MC; **TMmin:** T° media diaria mínima entre R5-MC; **TmaxA:** Temperatura máxima absoluta entre R5.5-MC;

RMDA (Mj/m2): Radiación media diaria acumulada entre R5-PM; **PMRD (Mj/m2):** promedio de radiación media diaria entre R5.5-MC; **TminA:** temperatura mínima absoluta entre R5.5-MC.

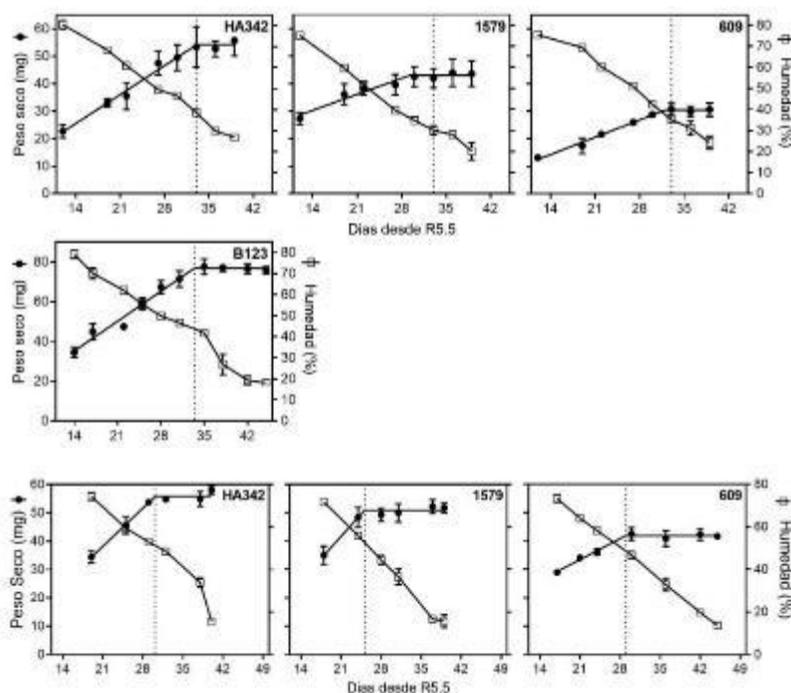


Fig. S. 3. 1. Dinámicas de peso seco unitario (mg) y contenido de humedad del aquenio (% en base peso fresco) en función de los días desde antesis media (R5.5) para los parentales evaluados en el experimento 4 (panel superior y medio: HA342, 1579, 609 y B123) y 5 (panel inferior: HA342, 1579 y 609). Cada punto representa la media \pm EE (n=4). El momento de madurez fisiológica (línea punteada sobre el eje de las abscisas) se obtuvo mediante un ajuste bilineal del peso seco del aquenio (Rondanini *et al.*, 2007).

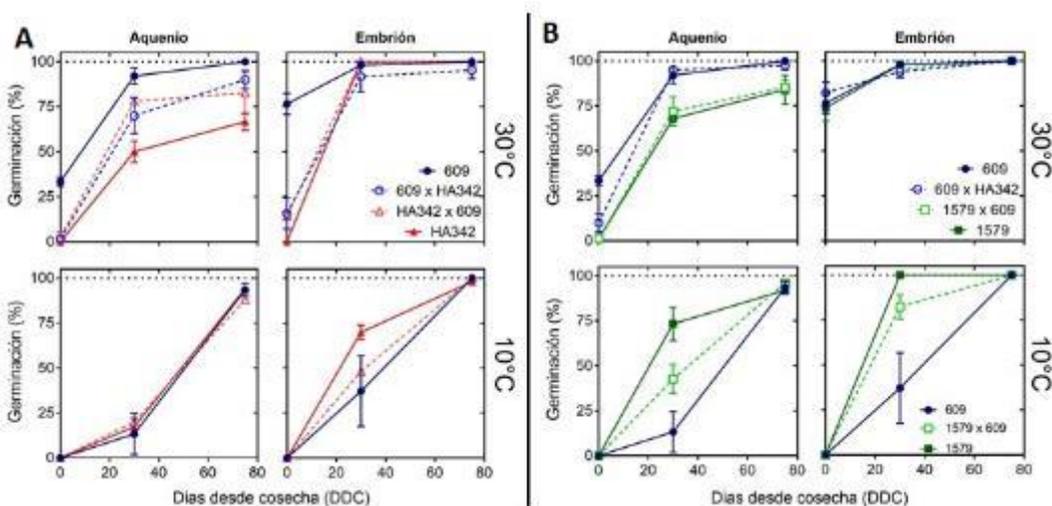


Fig. S. 3. 2. Evolución de la germinación final (%) durante el almacenaje postcosecha (en días desde cosecha –DDC–) para dos sistemas de cruzas (A, HA342:609; B, 1579:609). Se muestran los parentales 609, HA342, 1579 e híbridos recíprocos (609xHA342, 609x1579, HA342x609, 1579x609). Se observa la germinación de aquenios y embriones a dos temperaturas opuestas en el rango de incubación (30 y 10°C, panel superior e inferior respectivamente). Los datos corresponden al experimento 5. Cada punto representa la media \pm su EE (n=3).

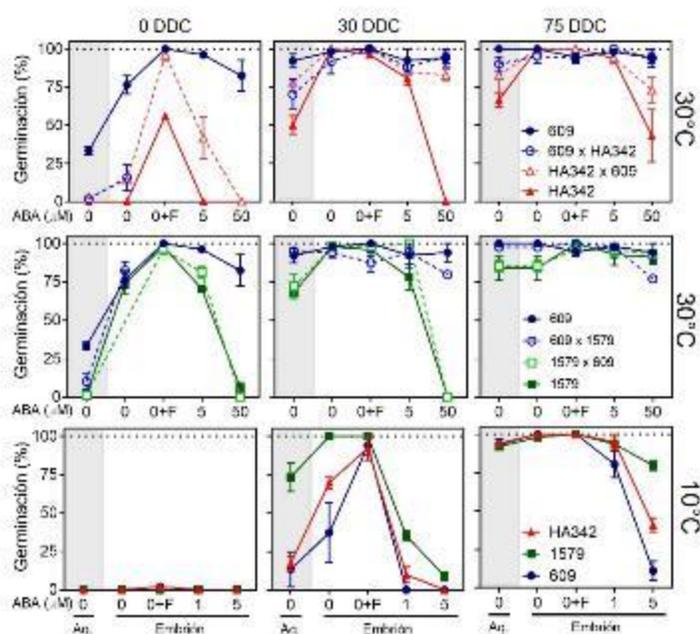


Fig. S. 3. 3. Respuesta a ABA exógeno para los parentales y sus cruza reciprocas. 609, 1579, HA342, 609x1579, 1579x609 y HA342x609. Germinación de achenos y embriones en agua destilada (0), embriones en soluciones con Fluridone 100 μ M (0+F) combinado con ABA 5, 50 (a 30°C, primeras dos filas) y 1, 5 μ M (10°C, fila inferior) a cosecha (0 DDC) y en diferentes tiempos durante la postcosecha (30 y 75 DDC). Los datos corresponden al experimento 5 y cada punto representa la media \pm su EE (n=3).

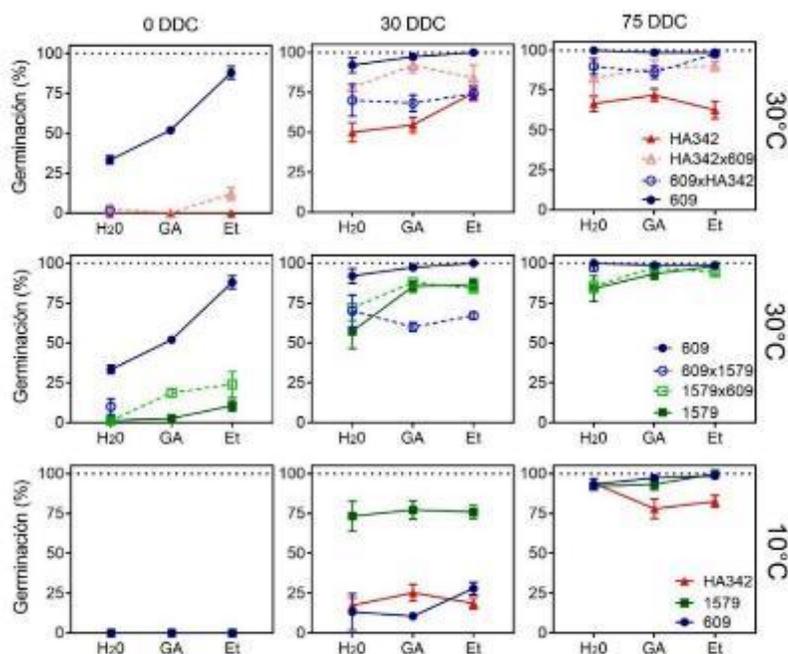


Fig. S. 3. 4. Respuesta a GA₃ y etefón exógeno en los parentales y sus cruza reciprocas. Genotipos: 609, 1579, HA342, 609x1579, 1579x609 y HA342x609. Germinación de achenos en agua destilada, soluciones con GA 100 μ M y Etefón 50 μ M a 30°C (primeras dos filas) y 10°C (fila inferior) a cosecha (0 DDC) y diferentes tiempos durante la postcosecha (30 y 75 DDC). Los datos corresponden al experimento 5 y cada punto representa la media \pm su EE (n=3).

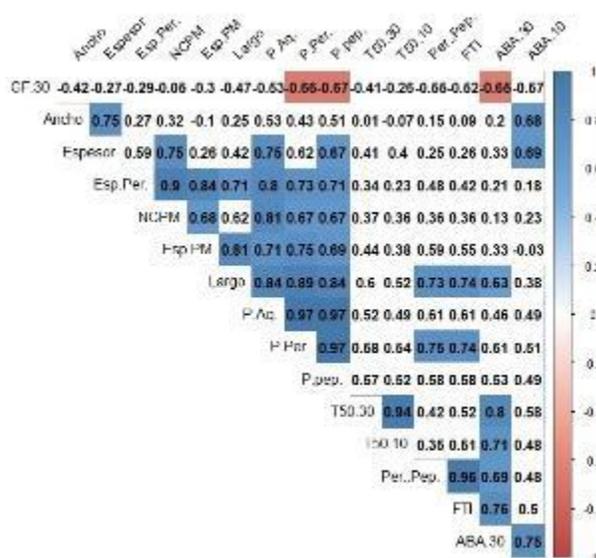


Fig. S. 3. 5. Matriz de correlación entre variables de dormición y características morfológicas del aquenio. Variables de dormición: germinación final a cosecha a 30° (GF.30), tiempo durante la postcosecha en alcanzar el 50% de germinación a 30° y 10° (T_{50.30} y T_{50.10}), factor de termo-inhibición (FTI), respuesta de embriones incubados en ABA a 30° y 10° (ABA.30 y ABA.10). Variables físicas del aquenio: largo, ancho y espesor del aquenio, espesor del pericarpio (Esp.Per.) y parénquima medio (Esp.PM), numero de capas de células del parénquima medio (NCPM), peso de mil en aquenios (P.Aq.), pepitas o semillas (P.Pep.), pericarpios (P.Per.), relación pericarpio-pepita (Per.:Pep). Los recuadros en color azul o rojo indican correlaciones estadísticamente significativas (p<0.05).

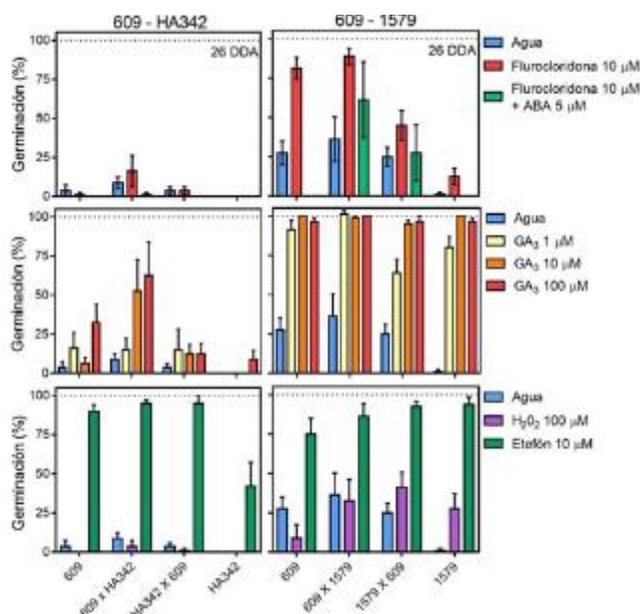


Fig. S. 3. 6. Germinación final (%) de embriones para dos sistemas de cruzas (609 y HA342, 609 y 1579) durante el desarrollo avanzado del fruto (26 DDA) a 30°C de incubación. Los gráficos de la izquierda muestra germinación de embriones en agua, Flurocloridona 10 µM y Flurocloridona 10 µM con ABA 5 µM, los ubicados en la parte central muestran la germinación de embriones en agua y giberelinas (GA₃ 1, 10 y 100 µM), y los de la derecha muestran la germinación en agua, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 100 µM y etefón 10 µM. Los datos corresponden al experimento 4 y cada barra representa la media ± su EE (n=4).

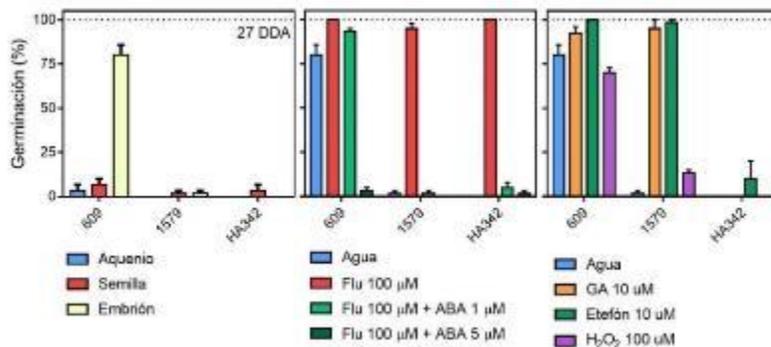


Fig. S. 3. 7. Germinación final (%) de los tres parentales (609, 1579 y HA342) durante el desarrollo avanzado del aquenio (27 DDA) incubados a 30°C. El gráfico de la izquierda muestra un ensayo de partes del fruto (aquenios, semillas y embriones), en el centro se muestra sobre embriones en agua, Fluridone 100 µM y Fluridone 100 µM con ABA 1 y 5 µM, y finalmente a la derecha se observa sobre embriones en agua, GA 10 µM, etefón 10 µM y H₂O₂ 100 µM. Los datos corresponden al experimento 5 y cada barra representa la media ± su EE (n=4).

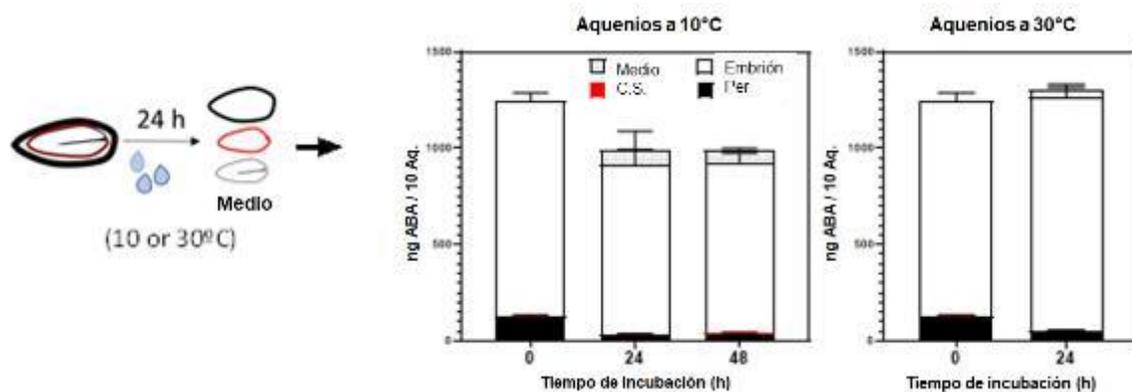


Fig. S. 3. 8. Contenido endógeno de ABA para las distintas estructuras del aquenio (embrión, cubierta seminal -cs- y pericarpio -per-) en seco y en el medio incubación luego de tiempos de incubación a 10 (24, 48 h) y 30°C (24h). Los aquenios corresponden al genotipo 1552 del experimento 1 del capítulo 2 una vez alcanzados altos valores de germinación durante el almacenaje a ambas temperaturas. Se realizaron triplicados de muestras con 10 aquenios enteros, incubados en cajas de Petri con 4 ml de agua destilada y 1 papel de filtro. Se tomó una muestra de 0,5 ml del medio de incubación de los aquenios, se colocaron en tubos eppendorf y se almacenaron a -80°C. Se pesaron las cajas de Petri con el volumen remanente y luego las placas secas para estimar el volumen de agua y la cantidad de ABA total en el medio, y así calcular el volumen de incubación remanente. En las muestras de partes de frutos (pericarpios, cubiertas seminales, y embriones), se guardó, pesó y molió toda la muestra. Cada barra representa la media ± su EE (n=3).

Cuadro S. 4. 1. Resultados de ANOVA de arreglo factorial para los CH obtenidos durante el almacenaje en cada uno de los experimentos (6,7,8). Referencia de significancia: 0 ‘***’ 0,001 ‘**’ 0,01 ‘*’ 0,05 ‘.’ 0,1 ‘ ’ 1,0.

Valor p					
	Genotipo	DDA	CHxTA	CH	TA
Experimento 6	1579	37	0,0177 *	-	-
		77	0,084	<0,001***	<0,001***
	600	30	0,004**	-	-
		70	0,95	<0,001***	<0,001***
Experimento 7	600	30	0,22	<0,001***	<0,001***
		70	0,54	<0,001***	0,17
Experimento 8	600	30	0,027*	-	-

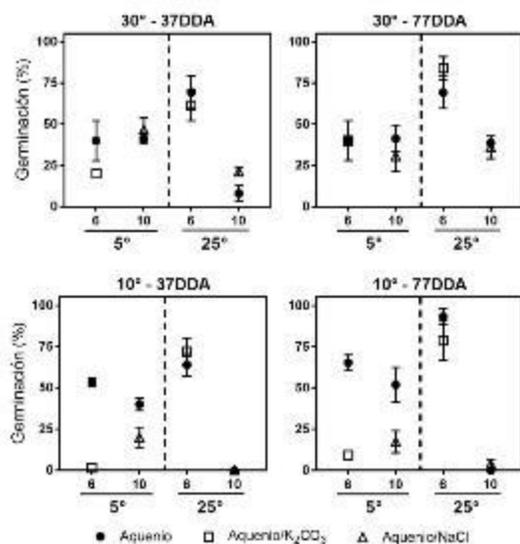


Fig. S. 4. 1. Germinación final de aquenios almacenados en una atmosfera normal con dos CH iniciales (6 y 10%) y con sales saturadas (NaCl, K₂CO₃) que alcanzan distintas HRe, a dos TA contrastantes (5 y 25°C). Se muestran los resultados de germinación para dos temperaturas de incubación (30 y 10°C) en dos momentos distintos durante el almacenaje (37 y 77 DDA). Cada punto representa la media ± EE (n=3).

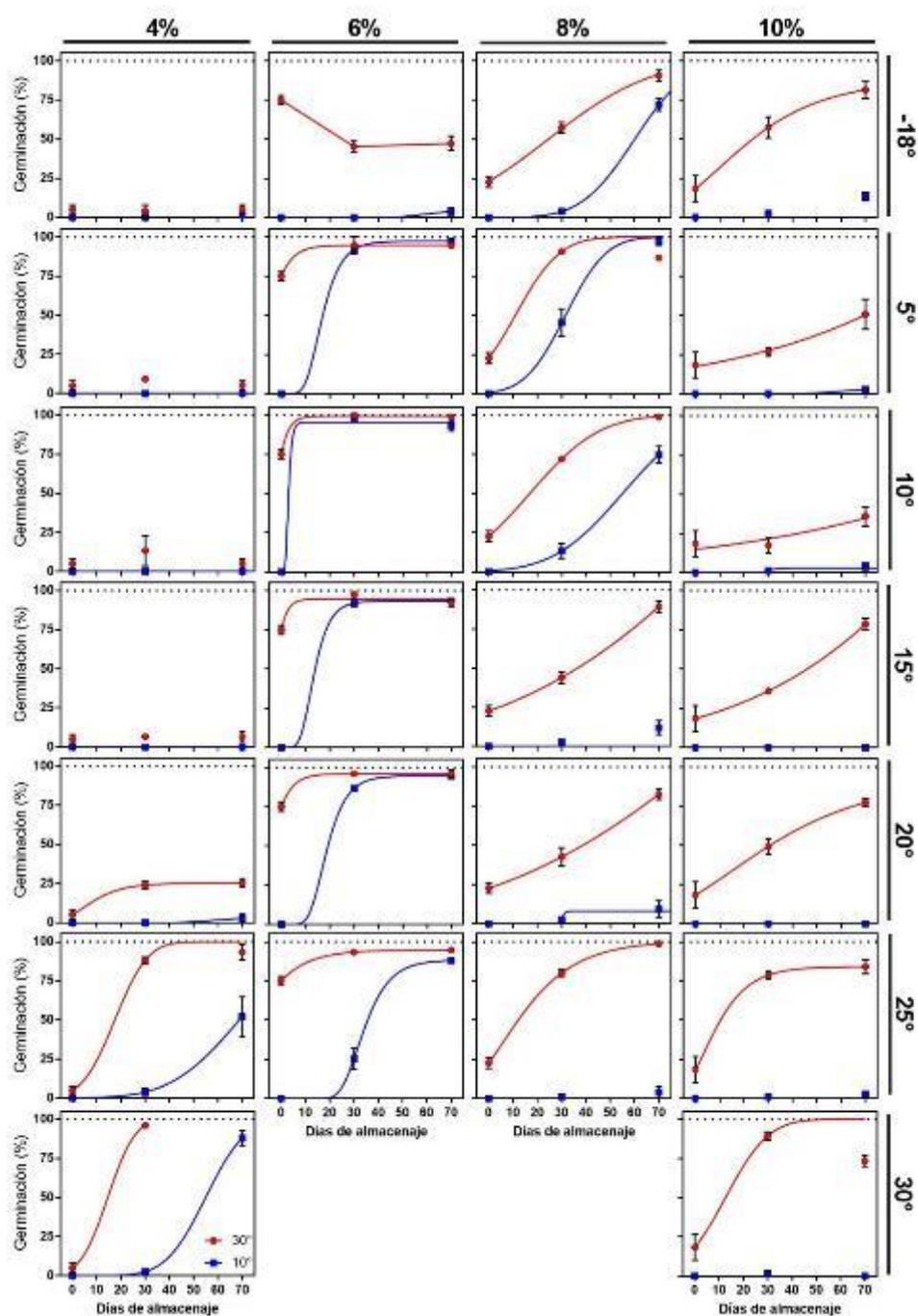


Fig. S. 4. 2. Porcentaje final de germinación en función de los días de almacenaje para dos temperaturas de incubación (30° -puntos y líneas rojas- y 10°C -cuadrados y líneas azules-). Cada grafico representa una condición de almacenaje de contenido hídrico (columnas: 4, 6, 8, 10%) y la temperatura (filas: -18, 5, 10, 15, 20, 25, 30°C) para el genotipo 600 del experimento 6. Cada punto representa la media \pm EE (n=3).

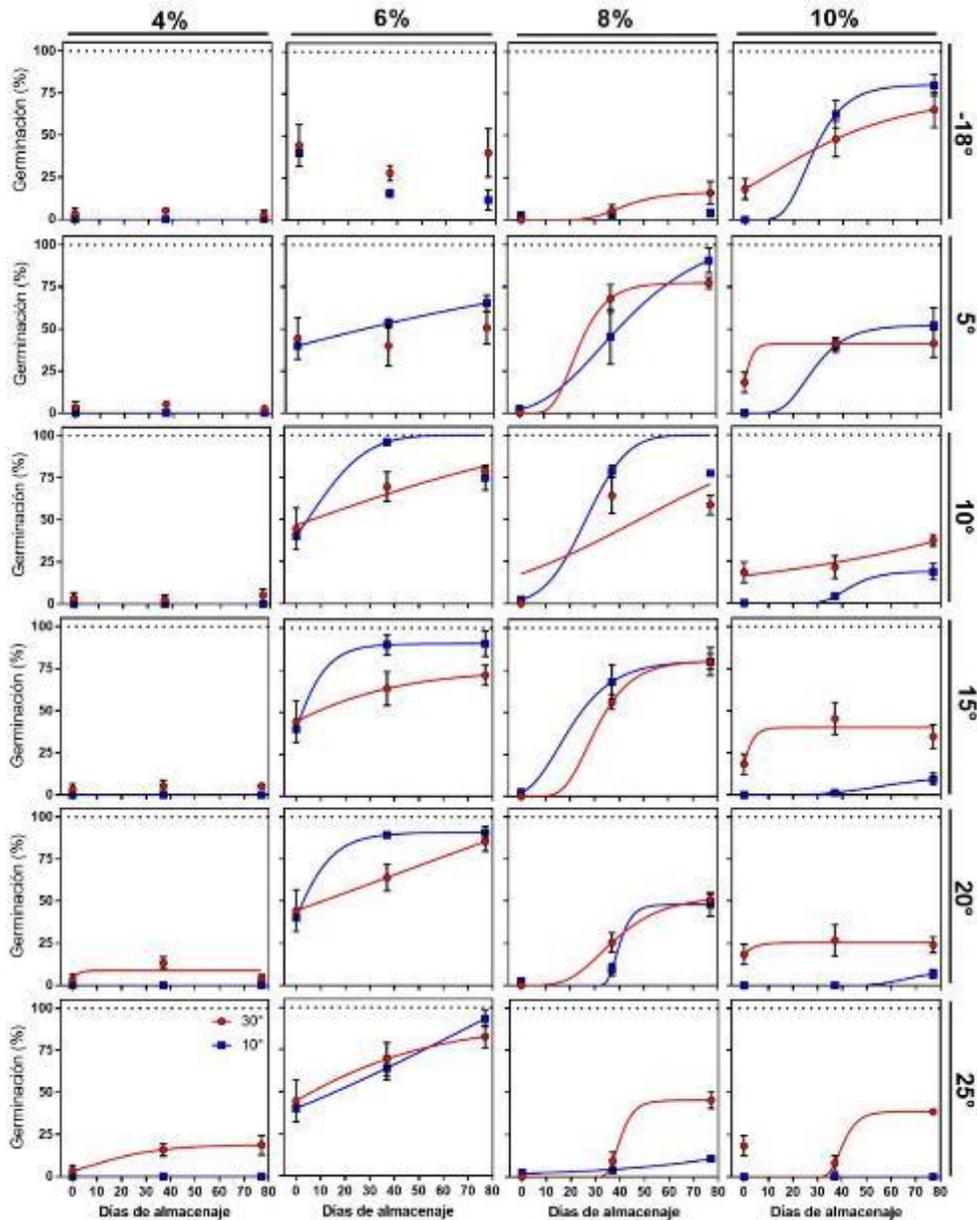


Fig. S. 4. 3. Porcentaje final de germinación en función de los días de almacenaje para dos temperaturas de incubación (30° -puntos y líneas rojas- y 10°C -cuadrados y líneas azules-). Cada grafico representa una condición de almacenaje de contenido hídrico (columnas: 4, 6, 8, 10%) y la temperatura (filas: -18, 5, 10, 15, 20, 25°C) para el genotipo 1579 del experimento 6. Cada punto representa la media \pm EE (n=3).

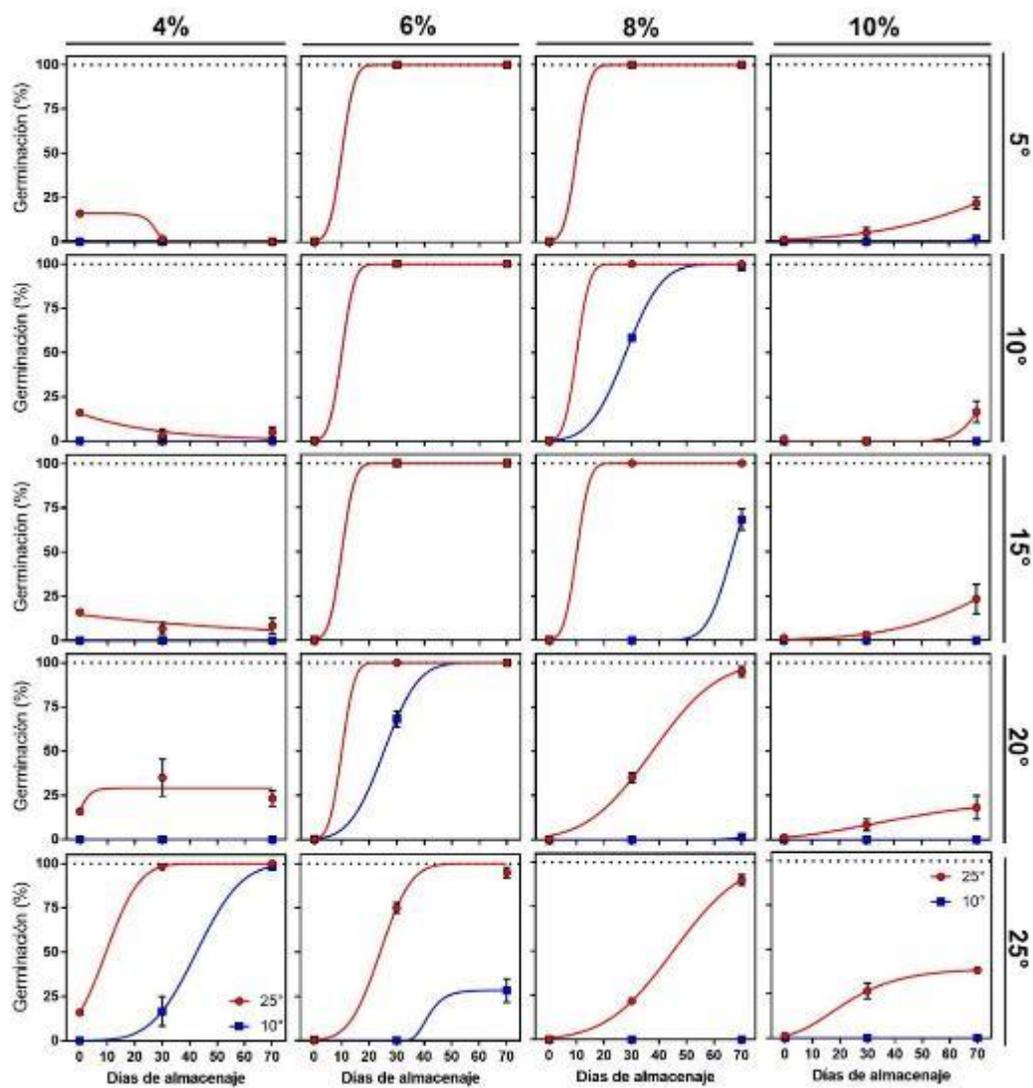


Fig. S. 4. 4. Porcentaje final de germinación en función de los días de almacenaje para dos temperaturas de incubación (25° -puntos y líneas rojas- y 10°C -cuadrados y líneas azules-). Cada grafico representa una condición de almacenaje de contenido hídrico (columnas: 4, 6, 8, 10%) y la temperatura (filas: 5, 10, 15, 20, 25°C) para el genotipo 600 del experimento 7. Cada punto representa la media \pm EE (n=3).

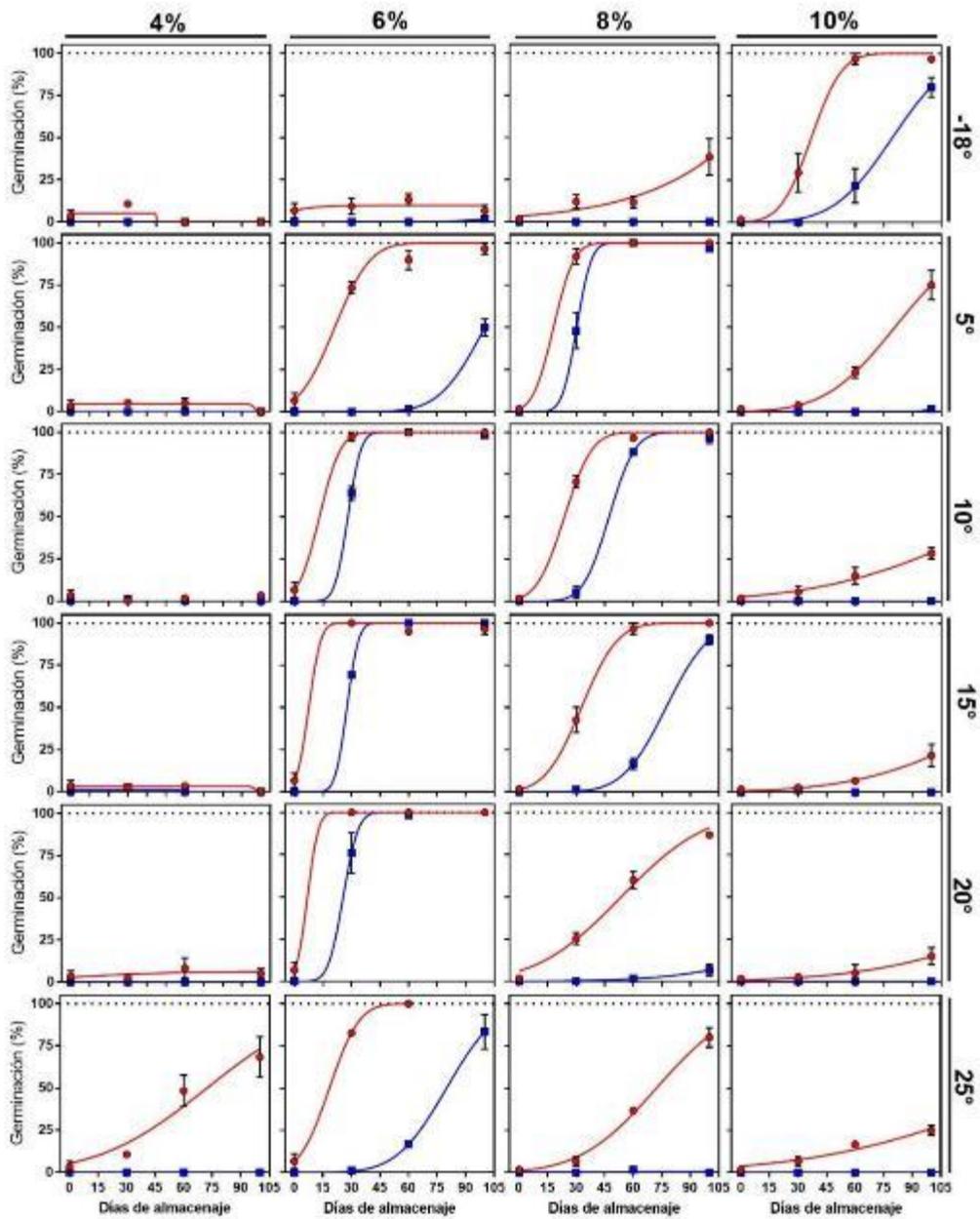


Fig. S. 4. 5. Porcentaje final de germinación en función de los días de almacenaje para dos temperaturas de incubación (25° -puntos y líneas rojas- y 10°C -cuadrados y líneas azules-). Cada grafico representa una condición de almacenaje de contenido hídrico (columnas: 4, 6, 8, 10%) y la temperatura (filas: -18, 5, 10, 15, 20, 25°C) para el genotipo 600 del experimento 8. Cada punto representa la media \pm E.E. (n=3).

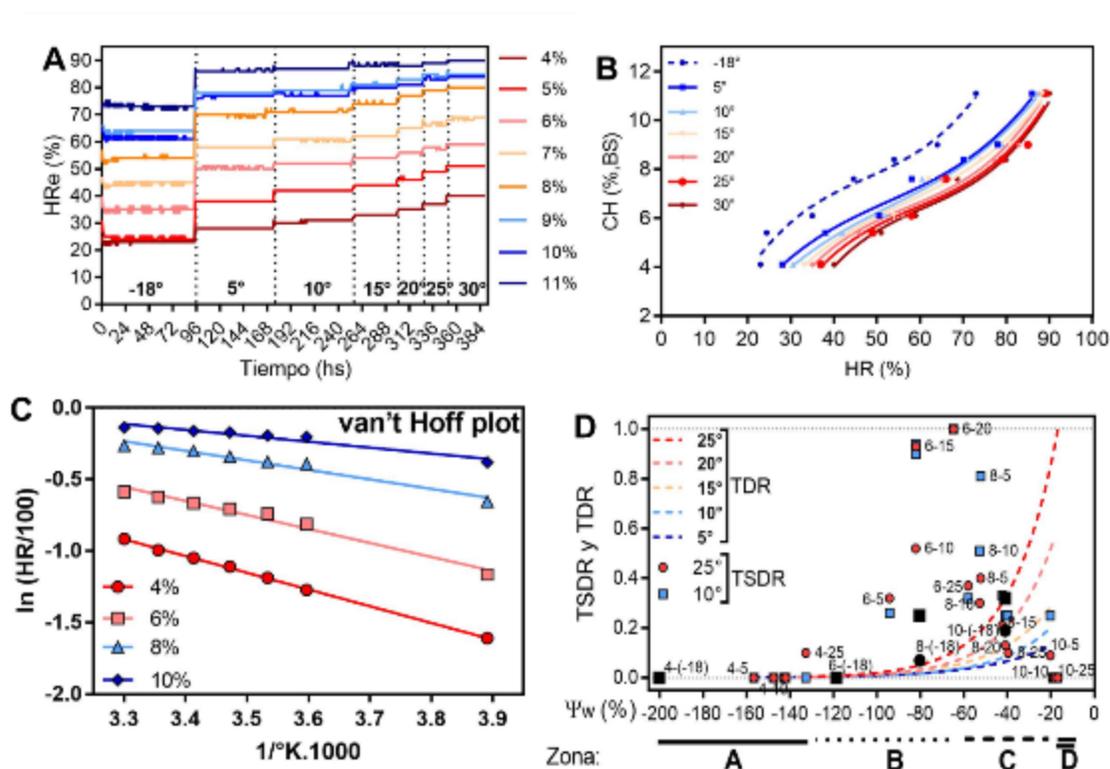


Fig. S. 4. 6. (A) Humedad relativa de equilibrio (HRe) medida durante el almacenaje (h) en muestras con distintos CH (≈ 4 -11%) durante sucesivas TA (-18° , $+5$, 10 , 15 , 20 , 25 , 30°C). El lapso de medición de HR y TA fue de 1 h. (B) Curva de adsorción para el genotipo 600, se muestra el CH en base PS de los aquenios en función de la HRe para distintas TA (en líneas: -18° , $+5$, 10 , 15 , 20 , 25 y 30°C), ajustando modelos polinómicos de grado tres. (C) Van't Hoff plot, logaritmo natural del cociente de HR/100 (o a_w) en función de la inversa de la TA en $^\circ\text{Kelvin}$. 1000 para cada CH (o isocoras: 4, 6, 8, 10%), donde la pendiente representa la entalpia de sorción aparente. (D) Modelo de TSDR (para incubaciones a 25 y 10°C) y TDR en función (para TA de 5 - 25°C) del ψ_w de los tratamientos de almacenaje (CHxTA).

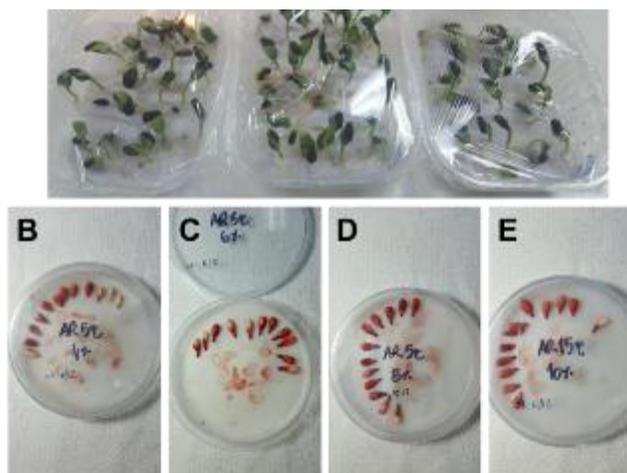


Imagen S. 4. 1. (A) Plántulas crecidas en cámara de los tratamientos de almacenaje (B, C, D, E) Tinción de semillas en tetrazolio de los tratamientos de almacenaje de 4, 6, 8% a 5°C y 10% a 15°C . Los tratamientos corresponden a un almacenaje de 7 meses del *experimento 6*.

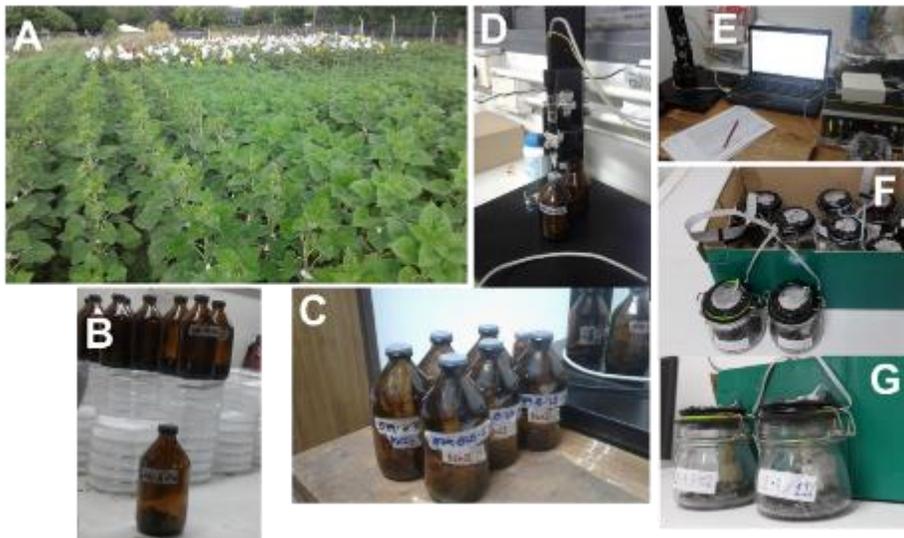


Imagen S. 4. 2. (A) Genotipos en estado R3-R4. (B, C) Tubos de vidrio donde se almacenaron los frutos de cada tratamiento. (D, E) Medición de los niveles de O₂ dentro de los frascos luego del almacenaje. (F, G) Frascos de vidrio con cierre hermético con los correspondientes sensores de HR y temperatura dentro de los mismos.

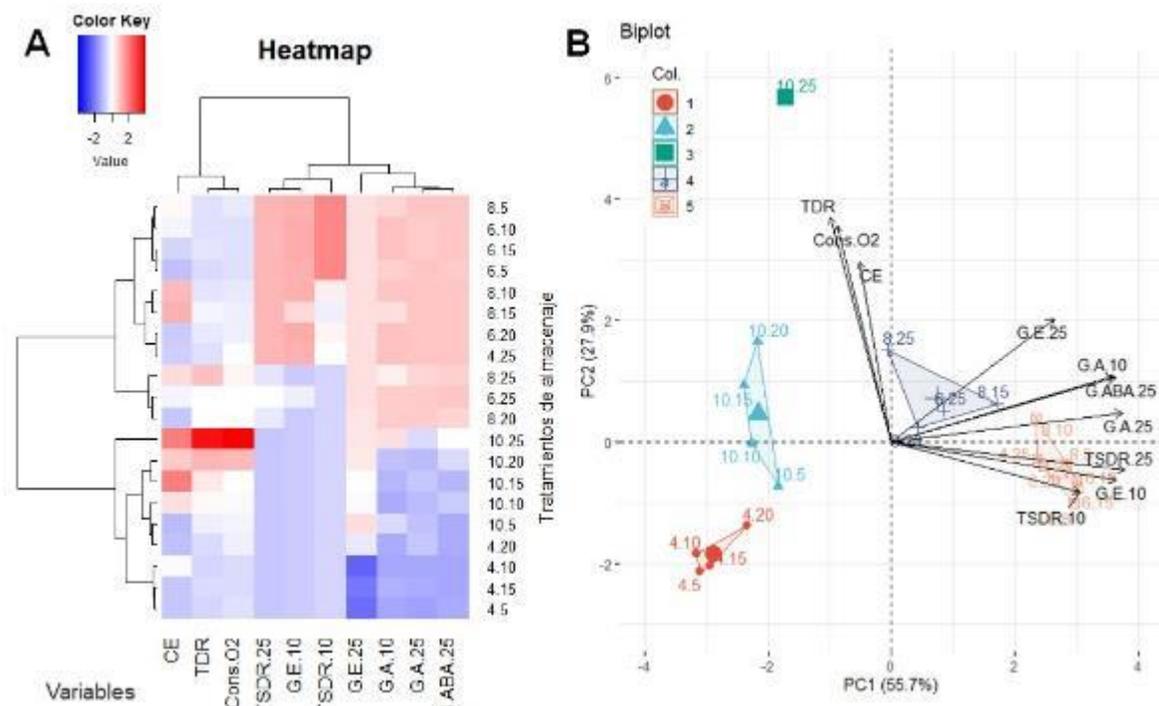


Fig. S. 4. 7. (A) Heatmap y (B) biplot obtenidos utilizando variables de dormición (TSDR, GE, GA, G.ABA -respuesta a los 70 DDA-) e indicadores de deterioro (TDR, consumo de O₂, CE -exp. 6-) para los tratamientos de almacenaje del experimento 7.