

**Regulación de la dormición por el ambiente materno en frutos de girasol (*Helianthus annuus* L.): estudio de los mecanismos fisiológicos involucrados.**

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

**Mailén Aldana Riveira Rubin**

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires - 2016

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



**FAUBA** Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Diego Batlla**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

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

Co-directora de tesis

**María Verónica Rodríguez**

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

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

Consejero de Estudios

**Mónica López Pereira**

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

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

## JURADO DE TESIS

Director de tesis

**Diego Batlla**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

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

JURADO

**Natalia Gabriela Izquierdo**

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctora en Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Mar del Plata)

JURADO

**Javier Francisco Botto**

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

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

JURADO

**Carlos Gosparini**

Título de grado (Universidad)

Título de posgrado (Universidad)

Fecha de defensa de la tesis: 20 de abril de 2022

**DEDICATORIA**

A mis padres, Javier y Sandra, y hermanas, Sol y Luna, que siempre me apoyaron y acompañaron en este camino.

A Tomi, quién desde el comienzo de esta aventura fue mi sostén y mi guía.

Al Tata, que siempre está y estará conmigo.

A la Abu, que siempre me pregunta “¿cómo están las plantas?” y se le ilumina la cara cada vez que le hablo de mi trabajo.

A mis abuelos.

*“La Agricultura siempre ha respondido con eficacia a las llamadas del peligro. Merece toda nuestra confianza.”*

*José Ignacio Cubero*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Diego y Vero, mis directores de tesis. Aunque no solo fueron eso. Fueron mis maestros, ayudantes de campo y laboratorio, muchas veces terapeutas... Gracias por la paciencia y el respeto con que siempre me trataron, por la disponibilidad a cualquier hora de resolver un problema, hablar de un protocolo, o de simplemente charlar.

A Chalo, compañero de doctorado y amigo. Tío, este camino hubiese sido mucho más difícil sin vos. Formamos el mejor equipo, gracias por tu ayuda en los experimentos y por las interminables charlas relacionadas (o no) al trabajo. Gracias por sacarme siempre una sonrisa (en realidad una carcajada) y por tu perseverante optimismo, aunque las cosas no vayan muy bien.

A Mónica López Pereira, mi consejera de estudios, por sus aportes a la tesis, tanto en la fase experimental como en la ardua escritura.

A Roberto Benech-Arnold por recibirme en el grupo de Ecofisiología de semillas allá por el 2014.

A Pedro Gundel, mi director de tesina de grado, quién me incentivó a seguir en la investigación y me introdujo en el mundo de la germinación.

A Juan y la Fiera Rodríguez, técnicos del campito experimental de la Cátedra de Cerealicultura, fieles ayudantes en mis intrincados ensayos a campo e interminables recuentos de germinación en el laboratorio. A “La Pity” y Cris Escudero, técnicos de IFEVA, por su asistencia a la hora de largar un experimento en el laboratorio.

A Silvina Enciso, por su eterna predisposición para realizar las determinaciones de ABA presentes en esta tesis. A Anita Mantese por su aporte relacionado a los cortes histológicos de pericarpo.

A los estudiantes de la carrera de Agronomía que asistieron mis experimentos: Esteban López, Josefina Goodall, Juan Woodgate y Belén Barreyro. Su ayuda fue indispensable para la recolección de datos de esta tesis.

A Nati Laspina y Cris Ríos, por su ayuda en mis primeros pasos dentro del grupo y por los graciosos momentos vividos en el labo de IFEVA.

A Paula Martín, secretaria de la Cátedra de Cereales.

A Lili y Flor, por sus cálidas palabras de bienvenida todas las mañanas.

Al los Ing. Agr. Julio González (INTA Pergamino), Ing. Agr. Mg. Daniel Álvarez (INTA Manfredi), Ing. Agr. Dr. Alejandro Presotto e Ing. Agr. Dr. Miguel Cantamutto (Universidad Nacional del Sur) por proveerme del material vegetal para realizar esta tesis.

A los Dres. Sergio Alemanno, Andrea Andrade y Ana Vigliocco, de la Universidad

Nacional de Río Cuarto, por las mediciones de GAs que realizaron y la predisposición a discutir los resultados.

A todos los integrantes de las Cátedra de Cereales, Cultivos Industriales y Producción Vegetal, que participaron en mi formación.

A CONICET por financiar mi doctorado a través de la Beca Doctoral y a la Cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires por haberme otorgado un espacio en el Campito Experimental para realizar mis experimentos y un espacio de oficina equipado.

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

*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 esta u otra institución.*

Mailén Aldana Riveira Rubin

**Publicaciones derivadas de la tesis**

**Riveira Rubin MA**, Arata GJ, López ED, Rodríguez MV, Batlla D. 2021. Dormancy attributes in sunflower achenes (*Helianthus annuus* L.): II. Sowing date effects. Crop Science, 1–16. <https://doi.org/10.1002/csc2.20612>

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xxiii
<b>Resumen</b> .....	xxv
<b>Abstract</b> .....	xxvi
<b>CAPÍTULO 1. Introducción general</b> .....	1
<i>1.1. La dormición como problemática en semillas de especies cultivadas.</i> .....	1
<i>1.2. Efectos del Ambiente Materno sobre el nivel de dormición.</i> .....	3
<i>1.3. Dormición embrionaria e impuesta por las cubiertas (participación de las distintas estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición).</i> .....	8
<i>1.4. Control hormonal de la dormición.</i> .....	13
<b>OBJETIVOS</b> .....	20
<b>HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>ESTRUCTURA DE LA TESIS</b> .....	23
<b>CAPÍTULO 2. Fechas de siembra tardías reducen el nivel de dormición en girasoles cultivados y silvestres</b> .....	24
<b>2.1. Introducción</b> .....	24
<b>2.2. Materiales y métodos</b> .....	25
<i>2.2.1. Sitio de los ensayos, tratamientos y material vegetal.</i> .....	26
<i>2.2.2. Condiciones generales de los ensayos a campo.</i> .....	26
<i>2.2.3. Ensayos de germinación.</i> .....	28
<i>2.2.4. Análisis estadístico.</i> .....	29
<b>2.3. Resultados</b> .....	31
<i>2.3.1. Caracterización del ambiente explorado por las plantas durante el desarrollo de los frutos. Experimento I.</i> .....	31
<i>2.3.2. Análisis de los componentes principales.</i> .....	34
<i>2.3.3. Análisis de conglomerados</i> .....	36
<i>2.3.4. Caracterización del ambiente explorado por las plantas durante el desarrollo del fruto. Experimento II.</i> .....	41
<i>2.3.5. Efecto de las fechas de siembra escalonadas sobre la germinación de las distintas estructuras que componen el fruto. Experimento II.</i> .....	43
<b>2.4. Discusión</b> .....	44
<b>CAPÍTULO 3. Efecto de la fecha de siembra sobre el nivel de dormición en frutos de girasol. Estudio de los mecanismos fisiológicos involucrados</b> .....	51
<b>3.1. Introducción</b> .....	51



<b>3.2. Materiales y métodos</b> .....	54
3.2.1. <i>Sitio de los ensayos, material vegetal y fechas de siembra</i> .....	54
3.2.2. <i>Condiciones generales de los ensayos a campo</i> .....	55
3.2.3. <i>Ensayos de germinación</i> .....	56
3.2.3.1. <i>Momentos de muestreo</i> .....	56
3.2.3.2. <i>Características de los ensayos de germinación</i> .....	56
3.2.4. <i>Determinación del contenido endógeno y la capacidad de síntesis de ABA durante el desarrollo de los frutos</i> .....	57
3.2.5. <i>Determinación de la anatomía del pericarpo</i> .....	58
3.2.6. <i>Germinación de frutos, semillas y embriones en hipoxia</i> .....	59
3.2.7. <i>Determinación del potencial de crecimiento del embrión</i> .....	60
3.2.8. <i>Análisis estadísticos</i> .....	60
<b>3.3. Resultados</b> .....	61
3.3.1. <i>Caracterización del ambiente explorado por las plantas durante el desarrollo de los frutos</i> .....	61
3.3.2. <i>Llenado y secado del fruto</i> .....	62
3.3.3. <i>Germinación de embriones en desarrollo</i> .....	66
3.3.3.1. <i>Agua, GAs y etefón</i> .....	66
3.3.3.2. <i>Sensibilidad al ABA de embriones en desarrollo</i> .....	68
3.3.4. <i>Contenido endógeno de ABA</i> .....	69
3.3.4.1. <i>Durante el desarrollo del fruto en la planta madre</i> .....	69
3.3.4.2. <i>Durante la incubación de frutos en desarrollo</i> .....	70
3.3.5. <i>Germinación de estructuras que componen el fruto a cosecha</i> .....	72
3.3.6. <i>Germinación de estructuras que componen el fruto durante el almacenaje post-cosecha</i> .....	74
3.3.7. <i>Sensibilidad de frutos y embriones al agregado exógeno de ABA, GAs y etefón a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha</i> .....	76
3.3.8. <i>Sensibilidad a la hipoxia y efectos sobre la sensibilidad al ABA</i> .....	78
3.3.9. <i>Características anatómicas del pericarpo y potencial de crecimiento del embrión</i> .....	80
<b>3.4. Discusión</b> .....	81
<b>CAPÍTULO 4. Efecto del ambiente térmico explorado durante la etapa de desarrollo del fruto en la planta madre sobre el nivel de dormición en frutos de girasol</b> .....	89
<b>4.1. Introducción</b> .....	89
<b>4.2. Materiales y Métodos</b> .....	91
4.2.1. <i>Sitio de los ensayos y material vegetal</i> .....	91
4.2.2. <i>Condiciones generales de los ensayos y tratamientos térmicos</i> .....	92
4.2.3. <i>Ensayos de germinación</i> .....	95

4.2.3.1. Momentos de muestreo. ....	95
4.2.3.2. Características de los ensayos de germinación. ....	95
4.2.4. Determinación del contenido endógeno y la capacidad de síntesis de ABA durante el desarrollo de los frutos. ....	96
4.2.5. Sensibilidad de los embriones a la hipoxia y su efecto sobre la sensibilidad de los embriones al ABA. ....	96
4.2.6. Análisis estadísticos. ....	97
<b>4.3. Resultados</b> .....	<b>97</b>
4.3.1. Descripción del ambiente térmico y del llenado y secado del fruto. Experimento III. ....	97
4.3.2. Germinación de embriones en desarrollo. Experimento III. ....	101
4.3.2.1. Fluridone, GAs y etefón. ....	101
4.3.2.2. Sensibilidad al ABA de embriones en desarrollo. ....	102
4.3.3. Contenido endógeno de ABA. ....	103
4.3.3.1. Durante la etapa final del desarrollo del fruto en la planta madre. ....	103
4.3.3.2. Durante la incubación, en frutos con 25% de humedad. ....	104
4.3.4. Germinación de estructuras que componen el fruto a cosecha. Experimento III. ..	105
4.3.6. Sensibilidad de embriones al de ABA durante el almacenaje post-cosecha. Experimento III. ....	107
4.3.7. Sensibilidad de embriones al ABA durante el almacenaje post-cosecha en hipoxia. Experimento III. ....	108
4.3.8. Caracterización del ambiente térmico. Experimento IV. ....	109
4.3.9. Germinación de estructuras que componen el fruto a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha. Experimento IV. ....	110
4.3.10. Sensibilidad de embriones al ABA durante el almacenaje post-cosecha. Experimento IV. ....	111
<b>4.4. Discusión</b> .....	<b>112</b>
<b>CAPÍTULO 5. Efecto de manipulaciones en la relación fuente destino durante la etapa de desarrollo del fruto en la planta madre sobre el nivel de dormición en frutos de girasol.</b>	<b>120</b>
<b>5.1. Introducción</b> .....	<b>120</b>
<b>5.2. Materiales y Métodos</b> .....	<b>122</b>
5.2.1. Sitio de los ensayos y material vegetal. ....	122
5.2.2. Tratamientos y condiciones generales de los ensayos a campo. ....	122
5.2.2.1. Variaciones en la relación FD (E1, E2 y E3). ....	122
5.2.2.2. Densidad–Raleo (E4). ....	124
5.2.2.3. Características generales de los ensayos a campo. ....	125
5.2.3. Ensayos de germinación. ....	125
5.2.3.1. Momentos de muestreo. ....	125

5.2.3.2. <i>Características de los ensayos de germinación.</i> .....	126
5.2.4. <i>Determinación del contenido endógeno en seco y durante la incubación durante el desarrollo de los frutos.</i> .....	126
5.2.5. <i>Determinación de la anatomía del pericarpo y velocidad de entrada de agua en frutos y semillas.</i> .....	127
5.2.6. <i>Sensibilidad a la hipoxia y su efecto sobre la sensibilidad de los embriones al ABA.</i> .....	127
5.2.7. <i>Potencial de crecimiento del embrión.</i> .....	128
5.2.8. <i>Análisis estadísticos.</i> .....	128
<b>5.3. Resultados</b> .....	128
5.3.1. <i>Caracterización del ambiente de llenado y del peso del fruto.</i> .....	128
5.3.2. <i>Germinación de embriones en desarrollo.</i> .....	131
5.3.3. <i>Contenido endógeno de ABA hacia el final del desarrollo del fruto en la planta madre y durante la incubación de frutos inmaduros.</i> .....	133
5.3.4. <i>Germinación a cosecha.</i> .....	135
5.3.5. <i>Germinación durante el almacenaje post-cosecha.</i> .....	136
5.3.5.1. <i>E1 (genotipo 1552).</i> .....	136
5.3.5.2. <i>E2 y E3 (genotipo 1579).</i> .....	137
5.3.5.3. <i>E4 (genotipo 1579).</i> .....	139
5.3.6. <i>Sensibilidad de embriones al ABA durante el almacenaje post-cosecha.</i> .....	140
5.3.7. <i>Sensibilidad a la hipoxia y efectos sobre la sensibilidad al ABA.</i> .....	142
5.3.8. <i>Características anatómicas del pericarpo y potencial de crecimiento del embrión.</i> .....	144
<b>5.4. Discusión</b> .....	145
<b>CAPÍTULO 6. Discusión General</b> .....	153
<b>6.1. Contraste de hipótesis y desarrollo de un esquema conceptual</b> .....	153
6.1.1. <i>Efectos del Ambiente Materno explorado durante la etapa de desarrollo del fruto sobre el nivel de dormición.</i> .....	153
6.1.2. <i>Ambiente materno, regulación hormonal y su relación con el nivel de dormición.</i> .....	158
<b>6.2. Aporte e implicancias agronómicas de la tesis</b> .....	164
<b>6.3. Investigaciones futuras</b> .....	168
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	171
<b>Figuras, cuadros y notas suplementarios al capítulo 2.</b> .....	183
<b>Figuras y cuadros suplementarios al capítulo 3.</b> .....	195
<b>Figuras y cuadros suplementarios al capítulo 4.</b> .....	202
<b>Figuras y cuadros suplementarios al capítulo 5.</b> .....	203
<b>Figuras, cuadros y notas suplementarios al capítulo 6.</b> .....	206

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1. 1.</b> Cambios en el contenido de ABA de ejes embrionarios de 26 días desde antesis que fueron incubados con y sin la presencia de fluridone en el medio de incubación. Además, se presenta la germinación de los embriones. Extraído de Le Page-Degivry y Garello (1992).....	15
<b>Cuadro 2. 1.</b> Nombres y orígenes de los genotipos estudiados. PN y C indican si los genotipos proceden de poblaciones naturalizadas o de líneas cultivadas, respectivamente. Los años 1, 2 y 3 fueron las estaciones de crecimiento en las que se evaluaron los genotipos. Material vegetal proporcionado por: <sup>1</sup> Ing. Agr. Dr. Alejandro Presotto e Ing. Agr. Dr. Miguel Cantamutto, Universidad Nacional del Sur; <sup>2</sup> Ing. Agr. Julio González, INTA Pergamino; <sup>3</sup> Ing. Agr. MSc Daniel Álvarez, INTA Manfredi; y <sup>4</sup> Ayerza Semillas S.A.....	27
<b>Cuadro 2. 2.</b> Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas en el período Antesis–MC según FS (Temprana o Tardía), genotipo y año evaluado, y la duración, en días, de la etapa Antesis–MC, para el Experimento I. <b>Los valores resaltados en negrita representan las medias (<math>\pm</math>DE) de las variables ambientales para todos los genotipos en cada FS.</b> Letras distintas indican diferencias significativas entre FS (p-valor<0.05). Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en $^{\circ}$ C; Fp (h): Fotoperíodo medio, en horas; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en $\text{MJ m}^{-2}$ ; Duración etapa Antesis–MC, en días.....	32
<b>Cuadro 2. 3.</b> Coeficientes de correlación “r” de Pearson entre los CP1 y CP2 y las variables ambientales registradas en la etapa Antesis–MC (Cuadro 2.2), para el Experimento I. Los asteriscos indican una relación significativa (p-valor<0.05). .....	36
<b>Cuadro 2. 4.</b> Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas entre Antesis-MC (R5.5, Schneiter y Miller, 1981), para el genotipo 1579 según FS, en la campaña 16/17 (experimento II). Letras distintas indican diferencias significativas entre FS (p-valor<0.05). Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en $^{\circ}$ C; Fp (h): Fotoperíodo medio, en horas; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en $\text{MJ m}^{-2}$ . ..	41
<b>Cuadro 3. 1.</b> Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas en el período Antesis–MC según FS, genotipo y año. Letras distintas indican diferencias significativas entre FS y año (p-valor<0.05). Las comparaciones se realizaron por genotipo. Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en $^{\circ}$ C; Fp (h): Fotoperíodo medio, en horas; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en $\text{MJ m}^{-2}$ . .....	62
<b>Cuadro 3. 2.</b> Contenido endógeno de ABA ( $\text{pg ABA mg PS}^{-1}$ ) en embriones (16/17) y ejes embrionarios (17/18) del genotipo 1552 extraídos de frutos en desarrollo (55% y 45% de humedad para 16/17 y 17/18, respectivamente) provenientes de FS tempranas y FS tardías, incubados en agua destilada y F100 a 25 $^{\circ}$ C. El contenido de ABA se midió en dos momentos: al comienzo y a las 24 horas de incubación. En este último momento se estimó la síntesis de ABA <i>de novo</i> . Se presentan datos medios de contenido de ABA ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa de los contenidos de ABA entre FS, tiempos de incubación y solución, con letras diferentes, cuando la interacción entre estos tres factores fue significativa (16/17: p-valor=0.045; 17/8: p-valor=0.011). El análisis se realizó por año. En todos los casos se indica la media ( $\pm$ EE, n=3) de germinación final (G!) de embriones, luego de 15 días de incubación, junto con la diferencia significativa (16/17: p-valor=0.020; 17/18: p-valor=0.018).....	71
<b>Cuadro 4. 1.</b> Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables térmicas registradas entre R6-MC, según FS y tratamiento térmico. Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en $^{\circ}$ C; HRMd (%): Humedad Relativa Media diaria, en %. .....	98

**Cuadro 4. 2.** Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en ejes embrionarios provenientes de frutos de 25% de humedad, incubados en agua destilada y F100 a 25°C, según FS y tratamiento térmico, del experimento III. El contenido de ABA se midió en dos momentos: al comienzo y a las 24 horas de incubación. En este último momento se estimó la síntesis de ABA de novo. Se presentan datos medios de contenido de ABA ( $\pm$ EE, n=3). Se realizaron dos análisis de varianza, por momento (antes y a las 24 de incubación\*), con su correspondiente test de Tukey. En todos los casos se indica la media ( $\pm$ EE, n=3) de germinación final embriones (GE!), luego de 15 días de incubación, junto con la diferencia significativa (embriones: p-valor=0.004)..... 105

**Cuadro 4. 3.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables térmicas registradas desde R6-MC, antes (R6-MF) o después de la transferencia (MF-MC) de macetas, del experimento IV. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias de temperaturas ( $\alpha$ =0.05). Antes de la transferencia: p-valor Temperatura media diaria (TMd)<0.001; p-valor Temperatura media diaria máxima (TMMxd)<0.001; p-valor Temperatura media diaria mínima (TMMnd)=0.153. Después de la transferencia: p-valor Temperatura media diaria<0.001; p-valor Temperatura media diaria máxima<0.001; p-valor Temperatura media diaria mínima=0.082). Abreviaturas: TMd (°C): Temperatura Media diaria, en °C; TMMxd (°C): Temperatura Media Máxima diaria, en °C; TMMnd (°C): Temperatura Media Mínima diaria, en °C..... 110

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1. 1.</b> Sección longitudinal de un fruto de girasol. Extraído de Aguirrezábal y Pereyra (1998). .....	10
<b>Fig. 1. 2.</b> Porcentaje de germinación a 11°C de incubación en función de los días desde cosecha, de aquenios (triángulos) y embriones (círculos) de girasol ( <i>Helianthus annuus</i> L.) provenientes de la FS temprana (símbolos oscuros) y tardía (símbolos claros). Las barras indican EE. Los valores entre paréntesis en la referencia indican la temperatura media de 10 a 18 horas para todo el período de desarrollo del fruto. Durante la post-cosecha, los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco. Extraído de Bodrone (2014). .....	12
<b>Fig. 1. 3.</b> 1. Contenido endógeno de ABA en función de los días de polinización para semillas de girasol del tratamiento control (a) y semillas tratadas con fluridone al 8vo día desde polinización (b). Cada punto corresponde a la media de 8 estimaciones individuales con su respectivo EE. 2. Germinación de embriones luego de 14 días de incubación en función de los días desde polinización, para tres años distintos. Extraído de Le Page-Degivry et al. (1990). .....	14
<b>Fig. 2. 1.</b> Biplot del primer y segundo componente principal basado en variables estandarizadas relacionadas con la dormición (G.F.10, G.E.10, G.F.25, G.E.25, T <sub>50</sub> .F.10 y T <sub>50</sub> .F.25), para el Experimento I. Las variables están representadas por vectores desde el origen, mientras que los genotipos por puntos. Los puntos rojos simbolizan los genotipos provenientes de FS tempranas, y los azules, de FS tardías. El número que precede al nombre del genotipo representa el año experimental en que se evaluó. .....	35
<b>Fig. 2. 2.</b> Dendrograma de los 20 genotipos agrupados según las diferencias entre FS tardías y tempranas de las variables de germinación analizadas (G.F.10, G.E.10, G.F.25, G.E.25, T <sub>50</sub> .F.10 y T <sub>50</sub> .F.25), para el Experimento I. .....	37
<b>Fig. 2. 3.</b> Ejemplos del comportamiento germinativo de genotipos según los grupos determinados por el AC (Fig. 2.2). A. Porcentaje final de germinación de frutos (barras llenas) y embriones (barras con líneas diagonales) a cosecha, incubados a 10 y 25°C, provenientes de FS tempranas (barras rojas) y tardías (barras azules). Porcentaje final de germinación de frutos en función de los días de almacenaje post-cosecha (DdAP), provenientes de FS tempranas (líneas rojas) y tardías (líneas azules), incubados a 10°C (B) y a 25°C (C). Las barras (A) y los puntos (B y C) representan los valores medios de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. En la Fig. S2.1 se presentan todos los genotipos de cada grupo. .....	38
<b>Fig. 2. 4.</b> Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones en función de los días de almacenaje post-cosecha, incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior), del genotipo 1579 del Experimento II. Las líneas representan cada una de las FS: 1 de septiembre (cuadrado rojo), 3 de octubre (rombo naranja), 1 de noviembre (triángulo verde), 1 de diciembre (triángulo invertido negro) y 4 de enero (círculo azul). Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .....	43
<b>Fig. 2. 5.</b> Fracción germinativa de los frutos en el rango térmico 0–50°C para 1552 (A), 1579 (B) y AAL (C) a los 30 días de almacenaje post-cosecha (año 15/16, Experimento 1). Las líneas rojas representan las FS tempranas y las azules las FS tardías. Las flechas en cada panel indican hacia qué dirección se corren los límites inferior [T <sub>i(50)</sub> ] y/o superior [T <sub>s(50)</sub> ] con el atraso en la FS. Los valores medios de T <sub>i</sub> , T <sub>s</sub> y $\theta$ T, con sus desviaciones estándar se muestran en la Cuadro S2.5 y las curvas de germinación observadas y simuladas por el modelo se presentan en la Fig. S2.5. Las simulaciones se realizaron según el modelo matemático propuesto por Batlla y Benech-Arnold (2015). Los supuestos del modelo se encuentran en las notas suplementarias al capítulo 2 (ver Desarrollo y validación de modelos). .....	48
<b>Fig. 2. 6.</b> Rendimiento por planta (en gramos, línea negra) y tiempo (en días) para alcanzar el 50% de la germinación de frutos (T <sub>50</sub> .F.25, línea roja) a 25°C en función de la FS. Se presentan valores medios ( $\pm$ EE, n=3) de rendimiento, mientras que el T <sub>50</sub> .F.25 se estimó mediante	

- interpolación lineal (ver sección 2.2.4. Análisis estadístico). Tres zonas fueron marcadas según el rendimiento y el nivel de dormición. Estos datos corresponden al Experimento II..... 50
- Fig. 3. 1.** Evolución del peso seco unitario del fruto (mg) en función de los días desde antesis (R5.5) para el genotipo 1552 evaluado en las campañas 16/17 (A), 17/18 (B) y 18/19 (C) y para el genotipo 1579 evaluado en 17/18 (D) y 18/19 (E). Las líneas rojas representan las FS tempranas y las azules, las FS tardías. Los puntos indican el promedio de peso seco ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las cosechas de las FS tempranas y tardías ocurrieron, según genotipos y años: 13 de enero y 3 de mayo para 1552 en 16/17; 7 de febrero y 6 de mayo para 1552 en 17/18; 26 de enero y 17 de mayo para 1552 en 18/19; 21 de febrero y 8 de mayo para 1579 en 17/18; y 7 de febrero y 17 de mayo para 1579 en 18/19..... 64
- Fig. 3. 2.** Evolución de la humedad del fruto (%) en función de los días desde antesis (R5.5) para el genotipo 1552 evaluado en las campañas 16/17 (A), 17/18 (B) y 18/19 (C) y para el genotipo 1579 evaluado en 17/18 (D) y 18/19 (E). Las líneas rojas representan las FS tempranas y las azules las FS tardías. Los puntos indican el promedio del porcentaje de humedad ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Se ajustó un modelo lineal a los datos de humedad de las FS tempranas (excepto en B) y un modelo bilineal a las FS tardías. Las tasas de secado de ambas FS se encuentran en el Cuadro S3.3. Para cada caso, se resalta el contenido de humedad promedio ( $\pm$ EE, n=3) de los frutos al momento de MF..... 65
- Fig. 3. 3.** Porcentaje final de germinación de embriones en desarrollo del genotipo 1552, incubados a 25°C, según el medio de incubación (agua, GAs 50 $\mu$ M o etefón 10 $\mu$ M) y año evaluado. FS tempranas se indican en rojo, y las FS tardías, en azul. Cuando la incubación se realizó en agua, las líneas son punteadas y si en el medio de incubación se incluyó GAs o etefón, las líneas son llenas. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las líneas negras indican el momento de MF..... 66
- Fig. 3. 4.** Porcentaje final de germinación de embriones en desarrollo del genotipo 1579, incubados a 25°C, según el medio de incubación (agua, GAs 50 $\mu$ M o etefón 10 $\mu$ M) y año evaluado. FS tempranas se indican en rojo, y las FS tardías, en azul. Cuando la incubación se realizó en agua, las líneas son punteadas y si en el medio de incubación se incluyó GAs o etefón, las líneas son llenas. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las líneas negras indican el momento de MF..... 67
- Fig. 3. 5.** Porcentaje final de germinación de embriones, incubados a 25°C, en función de la concentración de ABA, según FS y genotipo (1552, A y B; 1579, C y D), provenientes de frutos en desarrollo con un 40% y 25% de humedad. Los puntos rojos representan a las FS tempranas, y los azules a las FS tardías. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en F100. .... 68
- Fig. 3. 6.** A y B. Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en función del porcentaje de humedad de frutos en embriones enteros (genotipo 1552) y ejes embrionarios (genotipo 1579) extraídos de frutos provenientes de FS tempranas (líneas rojas) y FS tardías (líneas azules). C y D. Contenido endógeno de ABA hacia el final del desarrollo, para ambos genotipos. Los puntos indican la media del contenido endógeno de ABA y de germinación de embriones ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las flechas en los paneles A y B indican la MF y la MC en ambos genotipos. En el caso del 1552, los valores de humedad a MF son similares (47.2 y 48.0 para la FS Temprana y Tardía, respectivamente). La cosecha ocurrió en ambos genotipos y FS con una humedad de los frutos cercana a 11%..... 70

**Fig. 3. 7.** Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en función de las horas de incubación en ejes embrionarios del **genotipo 1579** (17/18) extraídos de frutos en desarrollo (35% de humedad) provenientes de FS tempranas (puntos y líneas rojas) y tardías (puntos y líneas azules), incubados en agua destilada. Se presentan datos medios de contenido de ABA ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las flechas negras indican el comienzo de la germinación de embriones para cada FS. Asimismo, se indica el valor promedio de germinación (G!) de embriones ( $\pm$ EE, n=3) luego de 15 días de incubación..... 72

**Fig. 3. 8.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones a cosecha, incubados a 10 y 25°C, según FS, genotipo y año. Las barras llenas, con barras diagonales y vacías indican la germinación de frutos, semilla o embriones, respectivamente. Las barras rojas representan a las FS tempranas y las azules, a las FS tardías. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). ..... 73

**Fig. 3. 9.** Porcentaje final de germinación de frutos (A, B y C), semillas (D y E) y embriones (F, G y H) del genotipo 1552 en función de los días desde el almacenaje post-cosecha, incubados en agua destilada, según FS y temperatura de incubación. Las líneas y puntos rojos representan a las FS tempranas y, los azules, a las FS tardías. Las líneas punteadas indican que la incubación de las estructuras del fruto se realizó a 10°C, mientras que las llenas, a una incubación de 25°C. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 75

**Fig. 3. 10.** Porcentaje final de germinación de frutos (A y B), semillas (C) y embriones (D y E) del genotipo 1579 en función de los días desde el almacenaje post-cosecha, incubados en agua destilada, según FS y temperatura de incubación. Las líneas y puntos rojos representan a las FS tempranas y, los azules, a las FS tardías. Las líneas punteadas indican que la incubación de las estructuras del fruto se realizó a 10°C, mientras que las llenas, a una incubación de 25°C. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 76

**Fig. 3. 11.** Porcentaje final de germinación de embriones del genotipo 1552 incubados a 25°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdAP), según FS y año. Los puntos rojos representan a las FS tempranas y los azules, a las FS tardías. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en F100. .... 77

**Fig. 3. 12.** Porcentaje final de germinación de embriones del genotipo 1579 incubados a 25°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdAP), según FS y año. Los puntos rojos representan a las FS tempranas y los azules, a las FS tardías. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en F100. .... 78

**Fig. 3. 14.** Porcentaje final de germinación de embriones de 40 días de almacenaje post-cosecha incubados a 25°C en condiciones crecientes de ABA, bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21% O<sub>2</sub> (líneas llenas) y 3% O<sub>2</sub> (líneas punteadas), según FS (rojo: tempranas; azul: tardías). Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en agua destilada. .... 79

**Fig. 3. 13.** Porcentaje final de germinación de frutos y semillas del genotipo 1552 y 1579 incubados a 25°C en agua destilada bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21% O<sub>2</sub> y 3% O<sub>2</sub>. Las barras rojas representan a las FS tempranas y las azules, a las FS tardías. Las barras llenas



indican que la incubación se realizó en una atmósfera de 21%, mientras que las barras con líneas horizontales, a una incubación de 3% O<sub>2</sub>. Para ambos genotipos, el ensayo se realizó a los 120 días de almacenaje post-cosecha, durante la campaña 17/18. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por estructura evaluada) según FS y concentración de O<sub>2</sub>, según la significancia del test de Kruskal–Wallis (1552 frutos: p-valor=0.204; 1552 semillas: p-valor=0.032; 1579 frutos: p-valor=0.006; 1579 semillas: p-valor=0.059). ..... 79

**Fig. 3. 15.** Corte histológico del pericarpo del tercio medio del capítulo de los genotipos de girasol 1552 y 1579 provenientes de FS temprana (A) y tardía (B), del año 18/19. Las referencias de las imágenes indican: ep: epidermis, cn: capa negra, es: esclerénquima, rp: radio parenquimático, cpi: capa de parénquima interna, cpa: capa de parénquima aplastada, cs: cubierta seminal (endosperma), emb: embrión. Escala = 50 $\mu$ m. (C) Espesor del pericarpo (um) de FS tempranas (barras rojas) y tardías (azules) para ambos genotipos. Las barras indican el promedio de espesor del pericarpo ( $\pm$ EE, n=3). ..... 81

**Fig. 3. 16.** Porcentaje de germinación de embriones, provenientes de frutos a los 40 días de almacenaje post-cosecha, en función de los días de incubación según FS (Temprana en rojo y Tardía en azul), para el año 18/19. Las líneas llenas indican que la incubación se llevó a cabo en agua destilada, mientras que las líneas punteadas, a una incubación en PEG6000 que genera un potencial osmótico de -1.5MPa. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 81

**Fig. 4. 1.** Estadios iniciales del cultivo en las macetas. .... 92

**Fig. 4. 2.** Cultivo en distintas etapas de pre antesis y antesis. Se puede observar cómo las macetas se encuentran equidistantes entre sí, para asegurar una competencia interplanta uniforme. .... 92

**Fig. 4. 3.** Plantas en el invernáculo. En el techo, se observa el sensor de temperatura y humedad relativa (HOBO InTemp Temp/Relative Humidity Data Logger–CX450), que registró datos de forma horaria. .... 93

**Fig. 4. 4.** Plantas control, fuera del invernáculo. Sensores portátiles registran datos de temperatura horaria (DAT–10, Datalogger de temperatura y humedad, Schwyz, China). .... 94

**Fig. 4. 5.** Evolución del peso seco unitario del fruto (mg) en función de los días desde antesis (R5.5) según FS (Temprana o Tardía) y tratamiento térmico (Control o +T), del experimento III. Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los puntos representan datos promedio del peso seco ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las fechas de cosecha para cada FS y tratamiento térmico fueron: FSTe–C: 20/1/2019; FSTe–T: 20/1/2019; FSTa–C: 1/5/2019; FSTa–T: 1/5/2019. Las flechas indican el momento en el que comenzó el tratamiento térmico (R6). .... 99

**Fig. 4. 6.** Evolución de la humedad del fruto (%) en función de los días desde antesis (R5.5) según FS (Temprana o Tardía) y tratamiento térmico (Control o +T), del experimento III. Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los puntos indican el promedio del porcentaje de humedad ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Se ajustó un modelo lineal a los datos de humedad de las FSTe–T y modelos bilineales para FSTe–C, FSTa–C y FSTa–T. Las tasas de secado de ambas FS se encuentran en el Cuadro S4.3 Para cada caso, se resalta el contenido de humedad promedio ( $\pm$ EE, n=3) de los frutos al momento de MF. .... 100

**Fig. 4. 7.** Porcentaje final de germinación de embriones, incubados a 25°C, según FS y tratamiento térmico, provenientes de frutos en desarrollo con un 40% y 25% de humedad, del experimento III. Se exhibe la respuesta germinativa en diferentes medios de incubación: agua (líneas punteadas), F100, GAs 50 $\mu$ M y etefón 10 $\mu$ M (líneas llenas). Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los

puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 102

**Fig. 4. 8.** Porcentaje final de germinación de embriones, incubados a 25°C, en función de la concentración de ABA, según FS y tratamiento térmico, provenientes de frutos en desarrollo con un 40% y 25% de humedad, del experimento III. Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 103

**Fig. 4. 9.** Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en función del porcentaje de humedad de frutos en ejes embrionarios extraídos de frutos provenientes de los tratamientos de FS y temperatura, del experimento III. Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los puntos indican la media del contenido endógeno de ABA ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. El asterisco en la FS temprana indica que hay diferencia significativa en los contenidos de ABA a cosecha entre tratamientos térmicos (p-valor=0.016). La MF de los frutos ocurrió con los siguientes porcentajes de humedad, según FS y tratamiento térmico: FSTe-C 44.2%; FSTe-T 46.5%; FSTa-C 45.7%; FSTa-T 46.7%. .... 104

**Fig. 4. 10.** Porcentaje final de germinación de frutos y embriones a cosecha, incubados a 25°C, según FS y tratamiento térmico, del experimento III. Las barras llenas indican la FS temprana, mientras que las que contienen líneas diagonales, representan la FS tardía; las barras negras indican al tratamiento control y las rojas, al tratamiento +T. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por estructura evaluada) con letras diferentes, cuando la interacción entre FS y tratamiento térmico fue significativa, según el test de Kruskal-Wallis (frutos: p-valor=0.026; embriones: p-valor=0.022). .... 106

**Fig. 4. 11.** Porcentaje final de germinación de frutos (A y C) y embriones (B y D) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha, incubados en agua destilada, según FS y tratamiento térmico, del experimento III. Las líneas y puntos grises representan al tratamiento control incubado a 10°C, las líneas y puntos rosas, al tratamiento +T a 10°C, las negras, al tratamiento control a 25°C y las rojas, al +T a 25°C. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 107

**Fig. 4. 12.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 25°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdAP), según FS y tratamiento térmico, del experimento III. Los puntos negros representan al tratamiento control y los rojos, al tratamiento +T. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en F100. .... 108

**Fig. 4. 13.** Porcentaje final de germinación de embriones de 40 días de almacenaje post-cosecha incubados a 25°C en condiciones crecientes de ABA, bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21% O<sub>2</sub> (líneas llenas) y 3% O<sub>2</sub> (líneas punteadas), según FS y tratamiento térmico, del experimento III. Líneas y puntos negros indican al tratamiento control, mientras que los rojos, al tratamiento +T. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en agua destilada. .... 109

**Fig. 4. 14. A.** Porcentaje final de germinación de frutos y embriones a cosecha, incubados a 25°C, según tratamiento térmico, del experimento IV. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por estructura evaluada) con letras diferentes, según el test de Kruskal-Wallis (frutos: p-valor=0.034;

- embriones:  $p$ -valor=0.047). B. Porcentaje final de germinación de frutos en función de los días desde el almacenaje post-cosecha, incubados a 25°C en agua destilada, según tratamiento térmico. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 111
- Fig. 4. 15.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 25°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdAP), según tratamiento térmico, del experimento IV. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como  $x=0$  están graficados como  $x=0.01$ , y representan a embriones incubados en F100..... 111
- Fig. 5. 1.** Fotos del tratamiento Defoliado. A) Cercano a cosecha. Desgranado. B) Remoción del 50% de los frutos; C) Remoción de los frutos de los tercios periférico e interior. .... 123
- Fig. 5. 2.** Evolución del peso seco unitario del fruto (mg) en función de los días desde antesis (R5.5) para los distintos experimentos y tratamientos de FD. Las líneas rojas representan los tratamientos Control y Raleo; las líneas verdes los tratamientos Defoliado y AD; las líneas negras, los tratamientos Desgranado y BD, y las azules, el tratamiento Sombreo. Los puntos representan datos promedio del peso seco ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las fechas de cosecha para cada experimento y tratamiento fueron: E1(1552): Control: 7/2/2018; Defoliado: 26/1/2018; Sombreo: 2/2/2018; Desgranado: 7/2/2018; E2(1579): Control: 20/2/2018; Defoliado: 8/2/2018; Desgranado: 20/2/2018; E3(1579): Control: 10/2/2019; Defoliado: 31/1/2019; Desgranado: 10/2/2019; E4(1579): para los tres tratamientos, la cosecha se realizó el 9/3/2019..... 129
- Fig. 5. 3.** Evolución de la humedad del fruto (%) en función de los días desde antesis (R5.5) para los para los experimentos de FD. Las líneas rojas representan los tratamientos Control y Raleo las líneas verdes los tratamientos Defoliado y AD; las líneas negras, los tratamientos Desgranado y BD; y las azules, el tratamiento Sombreo. Los puntos representan datos promedio de humedad del fruto ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. En cada uno de los experimentos, se muestran los valores promedio de humedad del fruto cuando el mismo alcanzó la MF. .... 130
- Fig. 5. 4.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 25°C provenientes de frutos en desarrollo con un 40% de humedad en E1 (1552) y E3 (1579). Los embriones fueron incubados en los siguientes medios: agua (gris), F100 combinado con soluciones de ABA con concentraciones crecientes (gama de colores rojo, naranja y amarillo), concentraciones crecientes de GAs (gama de colores azules) y etefón (gama de colores verdes). Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por genotipo) con letras diferentes, cuando la interacción entre los tratamientos de FD y concentración de hormonas fue significativa. El análisis se realizó según el test de Kruskal–Wallis (en cada panel se exhibe el  $p$ -valor de la interacción entre FD\*concentración de hormonas). .... 132
- Fig. 5. 5.** Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en ejes embrionarios en función del porcentaje de humedad de los frutos (A) y en función del tiempo de incubación en agua en frutos inmaduros con 40% de humedad (B) para los tres tratamientos de FD (Defoliado en verde, Control en rojo y Desgranado en negro) del E3 (1579). Los puntos indican la media del contenido endógeno de ABA ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. El asterisco en la figura A indica que las diferencias entre tratamientos de FD sobre el contenido de ABA a MC (11% de humedad del fruto) fue significativo ( $p$ -valor<0.001). En la figura B se indica el valor promedio de germinación (G!) de embriones ( $\pm$ EE,  $n=3$ ) luego de 15 días de incubación..... 135
- Fig. 5. 6.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones a cosecha incubados a 25°C en agua destilada, provenientes de los diferentes experimentos de FD (E1 1552; E2, E3 y E4 1579). Las barras llenas indican la germinación de los frutos enteros, las barras con líneas

diagonales blancas, las semillas y las barras vacías, los embriones. El color verde representa el tratamiento Defoliado o de AD; el color rojo, el tratamiento Control o Raleo; el color negro, el Desgranado o de BD y el color azul, el tratamiento Sombreo. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por experimento y estructura) entre tratamientos de FD con letras diferentes, según la significancia del test de Kruskal–Wallis (E1[1552] frutos: p-valor= 0.159; E1[1552] semillas: p-valor= 0.004; E1[1552] embriones: p-valor= 0.667; E2[1579] frutos: p-valor= 0.043; E2[1579] semillas: p-valor= 0.044; E2[1579] embriones: p-valor= 0.004; E3[1579] frutos: p-valor=0.036; E3[1579] embriones: p-valor=0.004; E4[1579] frutos: p-valor=0.014; E4[1579] embriones: p-valor=0.829).

..... 136

**Fig. 5. 7.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones del genotipo 1552 (E1) incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha provenientes de los tratamientos de FD. Las líneas rojas representan al tratamiento Control, las verdes, al tratamiento Defoliado, las azules, al Sombreo y las negras, al Desgranado. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 137

**Fig. 5. 8.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones del genotipo 1579 (E2) incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha provenientes de los tratamientos de FD. Las líneas rojas representan al tratamiento Control, las verdes, al tratamiento Defoliado y las negras, al Desgranado. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 138

**Fig. 5. 9.** Porcentaje final de germinación de frutos y embriones del genotipo 1579 (E3) incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha provenientes de los tratamientos de FD. Las líneas rojas representan al tratamiento Control, las verdes, al tratamiento Defoliado y las negras, al Desgranado. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 139

**Fig. 5. 10.** Porcentaje final de germinación de frutos y embriones del genotipo 1579 (E4) incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha. Las líneas rojas representan al tratamiento Raleo, las verdes, al tratamiento AD y las negras, al tratamiento BD. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. .... 140

**Fig. 5. 11.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 25°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdAP), para los distintos experimentos de FD (E1 1552; E2, E3 y E4 1579). Los puntos rojos representan al tratamiento Control y Raleo, los verdes, al tratamiento Defoliado y AD, los azules, al Sombreo y los negros, al Desgranado y BD. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en F100. .... 141

**Fig. 5. 12.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones, según corresponda, incubados a 25°C en agua destilada bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21% O<sub>2</sub> y 3% O<sub>2</sub>. Las barras verdes representan al tratamiento Defoliado, las rojas, al tratamiento Control, las negras, al Desgranado y las azules, al Sombreo. Para los E1(1552) y E2(1579), el ensayo se realizó a los 120 días de almacenaje post-cosecha, mientras que, para el E3(1579), a los 100 días. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por experimento y estructura) cuando la interacción entre los tratamientos FD y las concentraciones de O<sub>2</sub> fue significativa según la significancia del test de Kruskal–Wallis (E1[1552] frutos: p-valor<0.001; E1[1552] semillas: p-valor= 0.023; E2[1579]

frutos: p-valor=0.003; E2[1579] semillas: p-valor=0.010; E3[1579] frutos: p-valor=0.008; E3[1579] embriones: p-valor=0.014)..... 142

**Fig. 5. 13.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 25°C en agua destilada o en ABA 5µM, bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21%O<sub>2</sub> y 3%O<sub>2</sub>. Las barras grises representan a un medio de incubación con agua y a 21%O<sub>2</sub>; las barras rojas, a un medio con ABA 5µM en 21%O<sub>2</sub>; las barras con líneas diagonales grises, agua y 3%O<sub>2</sub>; y las barras con líneas rojas diagonales, ABA 5µM y 3%O<sub>2</sub>. Este ensayo se realizó en E3(1579), a los 100 días de almacenaje post-cosecha. Las barras indican el promedio de germinación (±EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación cuando la interacción entre los tratamientos FD, la concentración de O<sub>2</sub> y la concentración de ABA fue significativa según la significancia del test de Kruskal–Wallis (p-valor=0.004). ..... 143

**Fig. 5. 14.** Corte histológico del pericarpo del tercio medio del capítulo del genotipo 1579 (E3), para los tratamientos Defoliado, Control y Desgranado. Las referencias de las imágenes indican: ep: epidermis, hip: hipodermis, cn: capa negra, es: esclerénquima, rp: radio parenquimático, cpa: capa de parénquima aplastada, hv: haz vascular, cs: cubierta seminal (endosperma), emb: embrión. Escala = 50µm. .... 144

**Fig. 5. 15.** Porcentaje de germinación de embriones, provenientes de frutos a los 40 días de almacenaje post-cosecha, en función de los días de incubación según tratamiento de FD (Defoliado en verde, Control en rojo y Desgranado en negro) en el experimento 1579 (E3). Las líneas llenas y círculos indican que la incubación se llevó a cabo en agua destilada, mientras que las líneas punteadas y cuadrados, a una incubación en PEG6000 que genera un potencial osmótico de -1.5MPa. Los puntos (círculos y cuadrados) indican el promedio de germinación (±EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo..... 145

**Fig. 5. 16.** Relación entre el nivel de dormición de frutos incubados a 25°C (T50.F.25) y el peso de los frutos. Los cuadrados, triángulos, triángulos invertidos y círculos indican al E1(1552), E2(1579), E3(1579), y E4(1579), respectivamente. El color verde representa al tratamiento Defoliado y AD, el celeste al Sombreo, el rojo al Control y Raleo y el negro al Desgranado y BD. Se presentan las ecuaciones lineales significativas (correlaciones lineales con p-valor<0.05), separadas por genotipo..... 149

**Fig. 6. 1.** Relación entre el nivel de dormición de frutos incubados a 25°C medido a través del tiempo en alcanzar el 50% de germinación durante el almacenaje a 25°C en seco (T50.F.25) y el peso de los frutos para ambos genotipos. Los cuadrados indican las FS (rojo para las tempranas y azul para las tardías), los rombos los ensayos de FS\*Tratamiento térmico (FS tempranas símbolos llenos, FS tardías símbolos vacíos; rojo tratamiento de alta temperatura y negro tratamiento control), los triángulos los tratamientos FD (verde defoliado, rojo control y negro desgranado) y los círculos los tratamientos de densidad (verde AD, rojo raleo y negro BD)..... 157

**Fig. 6. 2.** Relación entre la germinación de frutos y la germinación de embriones incubados en dos concentraciones de ABA (10 y 50µM) a 25°C. Se presentan todos los datos de la tesis, desde la cosecha hasta el último momento del almacenaje post-cosecha evaluado en cada caso. Los cuadrados indican los experimentos del capítulo 3 (FS), los círculos los del capítulo 4 y los triángulos los del capítulo 5. Los diferentes colores representan los tratamientos: rojo para FS tempranas, tratamiento de alta temperatura (capítulo 4) y controles y raleo (capítulo 5); azul para FS tardías y sombreo; verde para Defoliado y AD; negro para controles de capítulo 4 y tratamientos de Desgranada y BD. La relación entre las dos variables fue significativa (p-valor<0.05) en ambos casos. .... 159

**Fig. 6. 3.** Modelo conceptual de regulación ambiental de la dormición del fruto entero de girasol. El AM determina cambios en el metabolismo del ABA durante el desarrollo del fruto en la planta madre que establece la sensibilidad al ABA de los embriones, mecanismo responsable de mantener el nivel de dormición del fruto durante el almacenaje post-cosecha. Por otro lado, el AM determina cambios en el espesor de las cubiertas y podría determinar cambios en las

propiedades químicas de las mismas (i.e. polifenoles). Estos cambios podrían afectar el nivel de hipoxia al que está expuesto el embrión y su sensibilidad al ABA. .... 161

**Fig. 6. 4.** Modelo conceptual de la regulación ambiental de la dormición del fruto de girasol derivado de los resultados obtenidos en esta tesis. Se identifican dos momentos: “Desarrollo y maduración del fruto en la planta madre” (fondo amarillo) y “Cosecha y Post-cosecha” (fondo blanco). El sector rojo indica condiciones del AM que determinan un mayor nivel de dormición del fruto (FS tempranas, alta temperatura y alta relación FD durante el desarrollo del fruto en la planta madre, “AM<sub>MADOR</sub>”), mientras que el sector azul, indica AM que determinan un menor nivel de dormición de los frutos (FS tardías, baja temperatura y baja relación FD, “AM<sub>MEDOR</sub>”). El AM afecta el metabolismo del ABA durante el desarrollo de los frutos y la señalización del ABA. AM<sub>MADOR</sub> presentan un mayor contenido endógeno de ABA de los embriones y una mayor síntesis de ABA durante la incubación de los embriones que determinan una mayor sensibilidad al ABA de los embriones durante el desarrollo tardío. Esta mayor sensibilidad al ABA de los embriones es el principal mecanismo responsable del mayor nivel de dormición de los frutos provenientes de estos AM a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha. En los AM<sub>MEDOR</sub>, se observa el efecto contrario (menor contenido endógeno y síntesis de ABA, menor sensibilidad al ABA de los embriones durante desarrollo tardío, y frutos con menor nivel de dormición a cosecha y durante la post-cosecha). El AM generó cambios anatómicos en el pericarpo. En AM<sub>MADOR</sub> el pericarpo del fruto fue más ancho, mientras que en los AM<sub>MEDOR</sub> fue más fino. Estos cambios anatómicos podrían afectar la difusión de O<sub>2</sub> a través del pericarpo y el nivel de hipoxia al que está sometido el embrión dentro del fruto. El nivel de hipoxia impuesto por las cubiertas aumenta la sensibilidad al ABA de los embriones. Este aumento es, a su vez, afectado por el AM, donde embriones expuestos a AM<sub>MADOR</sub> evidenciaron un mayor aumento en la sensibilidad al ABA en hipoxia que los embriones expuestos a AM<sub>MEDOR</sub>. Los efectos del AM sobre el metabolismo y señalización de ABA de los embriones determinan diferencias en el potencial de crecimiento de los embriones, donde embriones expuestos a AM<sub>MADOR</sub> presentaron un menor potencial de crecimiento que embriones de AM<sub>MEDOR</sub>. El asterisco en el triángulo central señala que los efectos del AM sobre el nivel de dormición de los frutos dependerán de la variación de las condiciones ambientales exploradas por las plantas dadas no solo por la magnitud de la variación en la FS y/o densidad de siembra, sino también por la latitud donde se implanten los cultivos. .... 163

**Fig. 6. 5.** Esquema conceptual de cambios en el rendimiento por superficie (líneas negras) y en el nivel de dormición (línea roja) frente a variaciones en la fecha (línea llena) y densidad de siembra (línea punteada). .... 165

**Fig. 6. 6.** Relación entre el tiempo letal 50 (en días, que representa el tiempo en el que las semillas pierden la viabilidad) y el nivel de dormición de frutos incubados a 25°C, por genotipo, para los tratamientos de FS (18/19, cuadrados, rojo FS temprana, azul FS tardía; capítulo 3), temperatura (círculos 1552, llenos FS temprana, vacíos FS tardía, rojo tratamiento alta temperatura, negro tratamiento control; capítulo 4) y FD (triángulos: verde defoliado, rojo control, negro desgranado; círculos 1579: verde AD, rojo raleo y negro BD; capítulo 5). En el anexo se describe brevemente la metodología utilizada para obtener los valores de TL50. La relación entre las dos variables fue significativa (p-valor<0.05) en el caso del genotipo 1579. .... 167

## ABREVIATURAS

- AM:** Ambiente materno  
**Desarrollo:** Etapa de desarrollo y maduración de los frutos en la planta madre  
**FS:** Fecha de siembra  
**TMd:** Temperatura Media diaria  
**TMMxd:** Temperatura Media Máxima diaria  
**TMMnd:** Temperatura Media Mínima diaria  
**Fp:** Fotoperíodo medio  
**RIMd:** Radiación Incidente Media diaria  
**HRMd:** Humedad Relativa Media diaria  
**CRA:** Contenido relativo de agua  
**FSTe–C:** Tratamiento “FS Temprana–Control” (capítulo 4, experimento I)  
**FSTe–T:** Tratamiento “FS Temprana–+T” (capítulo 4, experimento I)  
**FSTa–C:** Tratamiento “FS Tardía–Control” (capítulo 4, experimento I)  
**FSTa–T:** Tratamiento “FS Tardía–+T” (capítulo 4, experimento I)  
**C–+T:** Tratamiento “Control transferido a +T en MF” (capítulo 4, experimento II)  
**+T–C:** Tratamiento “+T transferido a Control en MF” (capítulo 4, experimento II)  
**FD:** Fuente destino  
**AD:** Tratamiento “alta densidad” (capítulo 5)  
**BD:** Tratamiento “baja densidad” (capítulo 5)  
**ABA:** Ácido abscísico  
**GAs:** Giberelinas  
**F100:** Fluridone en una concentración de 100µM  
**Et:** Etefón  
**ACC:** Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico  
**GA4:** Giberelina 4  
**O<sub>2</sub>:** oxígeno  
**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono  
**PEG 6000:** Polietilenglicol 6000  
**FAA:** Formaldehído-alcohol-acético  
**V4:** Aparición de cuarta hoja verdadera, de más de 4 cm de longitud (fase vegetativa). Schneiter y Miller, 1981.  
**R1:** Estrella visible (fase reproductiva). Schneiter y Miller, 1981.  
**R4:** La inflorescencia comienza a abrirse. Se ven las flores liguladas. Schneiter y Miller, 1981.  
**R5.1:** Primera antesis. Schneiter y Miller, 1981.  
**R5.5:** Antesis media. Schneiter y Miller, 1981.  
**R6:** La floración es completa y las flores liguladas comienzan a marchitarse. Schneiter y Miller, 1981.  
**MF:** Madurez fisiológica  
**MC:** Madurez de cosecha  
**PN:** Poblaciones naturalizadas (capítulo 2)  
**C:** Líneas cultivadas (capítulo 2)  
**n=3** número de repeticiones  
**ACP:** Análisis de los componentes principales  
**CP1:** Componente principal 1  
**CP2:** Componente principal 2  
**AC:** Análisis de conglomerados  
**F:** Estructura fruto  
**S:** Estructura semilla  
**E:** Estructura embrión  
**G.F.10:** Porcentaje final de germinación de frutos a cosecha incubados a 10°C  
**G.F.25:** Porcentaje final de germinación de frutos 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

**T50.F.10:** Tiempo de almacenaje post-cosecha (en días) necesario para alcanzar el 50% de germinación para frutos incubados a 10°C

**T50.F.25:** Tiempo de almacenaje post-cosecha (en días) necesario para alcanzar el 50% de germinación para frutos incubados a 25°C

**G!:** Germinación final, en porcentaje.

**GF!:** Germinación final de frutos, en porcentaje.

**GE!:** Germinación final de embriones, en porcentaje.

**D!:** Dormición

**DdAP:** Días de almacenaje post-cosecha

**DE:** Desvío estándar

**EE:** Error estándar

**r Pearson:** Coeficiente de correlación lineal

**nd:** sin datos

**ns:** no significativo

**$\alpha$ :** nivel de significancia

**Ti(50):** Temperatura del límite inferior

**$\sigma$  Ti(50):** Desviaciones estándar de la temperatura del límite inferior

**Ts(50):** Temperatura del límite superior

**$\sigma$  Ts(50):** Desviaciones estándar de la temperatura del límite superior

**$\theta$ T(50)(°Ch):** Tiempo térmico requerido para que germine el 50% de la población de semillas

**$\sigma$   $\theta$ T(50):** Desviación estándar del tiempo térmico

**Tb:** Temperatura base

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinación

**%:** Porcentaje

**pg:** Picogramos

**mg:** Miligramos

**g:** Gramos

**kg:** Kilogramos

**PT:** Peso turgente

**PF:** Peso fresco

**PS:** Peso seco

**$\mu$ m:** Micrómetro

**mm:** Milímetro

**cm:** Centímetro

**m:** Metro

**m<sup>2</sup>:** Metro cuadrado

**ha:** Hectárea

**$\mu$ l:** Microlitro

**ml:** Mililitro

**$\mu$ M:** Micromolar

**v/p:** Volumen/peso

**rpm:** Revoluciones por minuto

**MJ:** Megajoule

**seg:** Segundo

**h:** Horas

**MPa:** Megapascal

**°C:** Grados centígrados

**plantas m<sup>-2</sup>:** Densidad de plantas

**LEA:** Proteínas relacionadas al desarrollo tardío de la semilla (*late embryogenesis abundant proteins*)

**AM<sub>MADOR</sub>:** AM que determinan un mayor nivel de dormición de los frutos.

**AM<sub>MEDOR</sub>:** AM que determinan un menor nivel de dormición de los frutos.

**IFEVA:** Instituto de investigaciones fisiológicas y ecológicas vinculadas a la agricultura



## Resumen

Los frutos de girasol (*Helianthus annuus* L.) suelen presentar un alto nivel de dormición a cosecha y durante la post-cosecha, dificultando la utilización de los mismos como semilla para el próximo cultivo. Este nivel de dormición es afectado por el ambiente explorado por los frutos durante su desarrollo y maduración en la planta madre (ambiente materno). El objetivo de esta tesis fue investigar los mecanismos fisiológicos que estarían por detrás de esta regulación. Para ello, plantas de girasol fueron sembradas en distintas fechas y expuestas a variaciones en la temperatura y en las relaciones fuente destino durante el desarrollo y maduración del fruto. Se evaluó la germinación de frutos, semillas y embriones durante el desarrollo, a cosecha y en la post-cosecha bajo diferentes temperaturas, soluciones de hormonas (ABA, GAs y etileno) y concentraciones de O<sub>2</sub>. Se determinó el contenido endógeno de ABA, la capacidad de síntesis de ABA de los embriones y las propiedades anatómicas del pericarpo. Fechas de siembra tardías, bajas temperaturas y bajas relaciones fuente destino disminuyeron el nivel de dormición de los frutos. Esto se asoció a un menor contenido endógeno de ABA y menor capacidad de síntesis de ABA de los embriones durante su desarrollo, y a una menor sensibilidad al ABA de los embriones durante la post-cosecha. Los resultados obtenidos indican que los efectos del ambiente materno sobre la dormición en frutos de girasol estarían determinados por cambios en la fisiología del embrión, relacionados al metabolismo y señalización de ABA. Además del aporte en relación a la comprensión de los mecanismos fisiológicos responsables de la regulación ambiental de la dormición en el girasol, los resultados obtenidos en esta tesis son útiles para diseñar estrategias de manejo, por ejemplo, fechas de siembra, que disminuyan el nivel de dormición en la producción de semilla híbrida de girasol.

Palabras clave: dormición, girasol, fruto, embrión, pericarpo, ambiente materno, fecha de siembra, temperatura, relación fuente destino, metabolismo del ABA, sensibilidad al ABA.

## Abstract

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) fruits usually show a high level of dormancy at harvest and during postharvest, which hampers the use of the harvested fruits as seeds for the sowing of the next crop. Fruit dormancy level is affected by the environment explored by the fruits during their development and maturation in the mother plant (maternal environment). The aim of this thesis was to investigate the physiological mechanisms behind this regulation. To achieve this objective, sunflower plants were sown at different dates and exposed to variations in temperature and source-sink relationship during fruit development and maturation in the mother plant. Germination of fruits, seeds and embryos was evaluated during development, at harvest and postharvest under different temperatures, hormone solutions (ABA, GAs and ethylene) and O<sub>2</sub> concentrations. Also, endogenous ABA content and *in situ* ABA synthesis of embryos, and anatomical properties of the pericarp were determined. Late sowing dates, low temperatures and low source-sink ratio determined a lower fruit dormancy level. This lower dormancy was associated with lower endogenous ABA content and lower *in situ* ABA synthesis of developing embryos, and lower ABA sensitivity of matured embryos during postharvest. Results show that the effect of the maternal environment on sunflower fruit dormancy are determined by changes in the embryo physiology, related to ABA metabolism and signaling. In addition to help in the understanding of the physiological mechanisms responsible for the environmental regulation of sunflower fruit dormancy, the results obtained in this thesis are useful to design crop management strategies, such as sowing dates, to reduce the fruit dormancy level at harvest in the sunflower hybrid seed production.

**Keywords:** dormancy, sunflower, fruit, embryo, pericarp, maternal environment, sowing date, temperature, source-sink relationship, ABA metabolism, ABA sensitivity.

## **CAPÍTULO 1. Introducción general**

### 1.1. La dormición como problemática en semillas de especies cultivadas.

La semilla es el órgano móvil dentro del ciclo de vida de las plantas. La función principal que debe cumplir es establecer una nueva planta en un ambiente temporal y espacial que asegure la perpetuación de la especie (Footitt y Finch-Savage, 2017). Durante la formación de la semilla en la planta madre ocurren tres fases: (i) histodiferenciación, donde tiene lugar la división celular y diferenciación de estructuras, pero no hay aumento de tamaño, (ii) expansión celular, donde acontecen procesos de crecimiento por expansión y acumulación de sustancias de reserva y (iii) maduración y desecación, donde tienen lugar procesos que van a permitir que la semilla sobreviva a condiciones de desecación y se establece el nivel de dormición primaria (Bewley et al., 2013).

La dormición primaria es un bloqueo interno de la semilla que le impide germinar aun cuando las condiciones sean favorables para la germinación (Benech-Arnold et al., 2000; Hilhorst, 2007). Este fenómeno es un rasgo cuantitativo, en el que los lotes de semillas pueden presentar diferentes estados o “niveles de dormición” (Vegis, 1964). Estos niveles están relacionados con la amplitud del rango térmico para que ocurra la germinación, es decir, cuanto más bajo es el nivel de dormición, más amplio es el rango térmico en el que las semillas pueden germinar y *viceversa* (Benech-Arnold et al., 2000; Batlla y Benech-Arnold 2015). La presencia de un alto nivel de dormición a cosecha y durante la post-cosecha resulta una desventaja en especies de uso agrícola (Satorre et al., 2016). Uno de los objetivos principales en cualquier sistema productivo consiste en obtener y asegurar una germinación y emergencia uniforme, que faciliten las prácticas de manejo y optimicen el rendimiento y la calidad del cultivo sembrado. En este sentido, el mejoramiento genético ha disminuido la presencia de dormición en semillas de especies

cultivadas. En algunos casos, la selección en contra de la dormición fue tan extrema que los granos germinan incluso antes de ser cosechados (Rodríguez et al., 2015). Este fenómeno, conocido como brotado pre-cosecha disminuye la viabilidad de las semillas y altera la calidad de los granos de cereales (Lunn Major et al., 2001; Gualano et al., 2014). Sin embargo, en algunos cultivos y/o cultivares el mejoramiento no ha logrado eliminar del todo la dormición, y bajo determinadas condiciones ambientales las semillas suelen presentar un alto nivel de dormición al momento de la cosecha, lo que dificulta su uso como simiente para el próximo cultivo (Maiti et al., 2006). Este es el caso del girasol (*Helianthus annuus* L.), donde las semillas (estrictamente un fruto, cipsela o aquenio de ovario ínfero; de ahora en más “fruto”) suelen presentar un alto nivel de dormición a cosecha, que es dependiente del genotipo y del ambiente explorado por el cultivo durante la etapa de desarrollo y maduración de los frutos (es decir, del ambiente materno; de ahora en más “AM”) (Subrahmanyam et al., 2002; Vujaković et al., 2012; Hernández et al., 2017; Bodrone et al., 2017; Lachabrouilli et al., 2021). Así, para ciertos años y ambientes del cultivo, las semillas suelen presentar un alto nivel de dormición a cosecha que suele mantenerse durante un tiempo prolongado durante la post-cosecha, dificultando las tareas de procesamiento y comercialización de las mismas como simiente (Corbineau et al., 1989; Corbineau et al., 2006; Bodrone, 2014; Pizzorno, 2021), tanto en la producción destinada al mercado interno, como en aquella para mercados en contra-estación. En este último caso, la circunstancia de presentar lotes de semilla con dormición se agrava, ya que el plazo de tiempo que media entre la cosecha del cultivo y la siembra del siguiente, en el otro hemisferio, es menor. En ambas situaciones, las plantas procesadoras de semilla requieren la disponibilidad rápida de semilla “despierta” y en cantidades suficientes para justificar el comienzo de los procesos que incluyen la clasificación, el curado y, finalmente, el embolse de las partidas de semilla cosechada. Sin embargo, un alto nivel

de dormición frecuentemente observado en las semillas de girasol con posterioridad a su cosecha impide su rápida utilización industrial, lo que muchas veces determina la necesidad de almacenar las semillas bajo condiciones particulares, como cámaras frías, para intentar disminuir el nivel de dormición y acelerar los tiempos para el embolse. Así, la dormición se constituye en un factor que incide directamente en los tiempos y costos de producción de semilla en este cultivo (Bodrone, 2014).

### 1.2. Efectos del Ambiente Materno sobre el nivel de dormición.

El nivel de dormición que presentan los frutos de girasol al momento de la cosecha depende del genotipo y del ambiente explorado por el cultivo durante la etapa de desarrollo y maduración de los frutos en la planta madre (de ahora en más “desarrollo”). Más allá de la importancia de la variable genotípica en relación a la determinación de este carácter (Subrahmanyam et al., 2002; Maiti et al., 2006; Vujaković et al., 2012; Andrade et al., 2015; Roselló et al., 2016; Arata et al., 2021), resulta imprescindible estudiar y entender el efecto del ambiente como modulador del nivel de dormición si queremos ser capaces de predecir el comportamiento de un genotipo determinado en diferentes zonas de producción y fechas de siembra (de aquí en más “FS”). Numerosos trabajos han reportado que las condiciones ambientales que exploran las semillas durante su etapa de desarrollo en la planta madre, comúnmente denominado “efecto materno”, pueden afectar el nivel de dormición de las mismas a cosecha (Roach y Wulff, 1987; Fenner, 1991; Benech-Arnold et al., 1992; Gutterman, 2000; He et al., 2014; Macgregor et al., 2015; Fernández Farnoccia et al., 2019; 2021).

Este efecto materno es una combinación del microambiente que experimentan las semillas o frutos en relación a su posición en la planta madre y el ambiente biótico y abiótico experimentado por la planta madre durante el período de desarrollo de las

semillas (Gutterman, 2000). En relación a este último punto, existe vasta evidencia que indica que las condiciones ambientales durante el desarrollo de las semillas influyen en el nivel de dormición de las mismas. En general se ha observado que un bajo nivel de dormición se asocia con altas temperaturas, fotoperíodos cortos, luz con alta relación R/RL, sequía y alta disponibilidad de nitrógeno (Fenner, 1991). Sin embargo, existe una gran variabilidad inter e intraespecífica en la respuesta y en función del tipo de sistema experimental (experimentos a campo o experimentos manipulativos), además de la interacción que existe entre las distintas variables ambientales.

Una de las formas más sencillas de verificar el efecto del AM sobre el nivel de dormición primaria es exponer a las plantas a distintos ambientes durante el desarrollo de las semillas mediante variaciones en la FS. Resultados obtenidos en varias especies evidenciaron cambios significativos en el nivel de dormición ante variaciones en la FS de las plantas. Por ejemplo, en quinoa (*Chenopodium quinoa*) las FS tempranas determinaron un aumento del nivel de dormición a cosecha en relación a lo observado en FS tardías (Ceccato et al., 2011). Por su parte, Fernández Farnocchia et al. (2019) estudiando el efecto de la FS sobre el nivel de dormición primaria en semillas de *Polygonum aviculare*, registraron que las semillas provenientes de FS tempranas, de otoño e invierno, presentaron una dinámica de salida de dormición más lenta que semillas provenientes de FS tardías o de verano. Para el caso del girasol, Bodrone et al. (2017) observaron que los frutos desarrollados en FS tempranas presentaron un mayor nivel de dormición a cosecha y requirieron un mayor tiempo de almacenaje post-cosecha para la salida de la dormición que los frutos provenientes de FS tardías. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pizzorno et al. (2014), quienes también observaron una disminución del nivel de dormición en frutos de girasol a cosecha con el atraso en la FS. Más allá de estos resultados, aún no se conoce si los efectos del AM determinados por la

variación en la FS son comunes para una amplia gama de genotipos de girasol, ni cuáles serían los factores ambientales y los mecanismos que estarían detrás de esta regulación ambiental.

Dentro de los factores que podrían ser responsables de los efectos maternos sobre el nivel de dormición, la temperatura ha sido el más estudiado (Fenner, 1991). Por ejemplo, en cebada cervecera (Rodríguez et al., 2001), lechuga (Contreras, 2007), *Arabidopsis* (Kendall et al., 2011), trigo (Barrero et al., 2020), entre otras, mayores temperaturas durante la etapa de desarrollo de los frutos se asociaron con un menor nivel de dormición de las semillas maduras. Por el contrario, semillas de otras especies de interés agrícola como la soja (*Glycine max*) presentaron un mayor nivel de dormición a cosecha asociado a la ocurrencia de altas temperaturas durante el desarrollo de las semillas (Keigley y Mullen, 1986; Smith et al., 2008). El mismo comportamiento presentaron los frutos de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) (Ceccato et al., 2011). Respecto al cultivo de girasol, existen evidencias tanto en ensayos a campo como en maceta que mayores temperaturas durante el desarrollo del fruto generarían un mayor nivel de dormición en los frutos a cosecha. Por ejemplo, Fonseca (2000) expuso plantas de girasol creciendo en macetas a diferentes temperaturas contrastantes dentro del rango 13°C–36°C durante el período de desarrollo del fruto, observando que aquellos frutos expuestos a mayores temperaturas (31.6 y 35.7°C) presentaron una menor velocidad de germinación que aquellos expuestos a menores temperaturas. Asimismo, Rodríguez et al. (2003) observaron un efecto similar al exponer a plantas creciendo en maceta a temperaturas altas (35°C) durante todo el período de desarrollo del fruto, sin observar el mismo efecto cuando las plantas fueron expuestas a períodos de alta temperatura de menor duración (una semana). En plantas de girasol creciendo a campo, bajo distintos regímenes térmicos generados mediante el uso de carpas de polietileno (Bodrone et al.,

2017) se observaron resultados similares a los obtenidos en maceta: los frutos de girasol provenientes de los tratamientos de mayor temperatura durante la etapa de desarrollo del fruto presentaron un mayor nivel de dormición que los provenientes del tratamiento testigo. A su vez, estos autores determinaron que los tratamientos de mayor temperatura sólo eran efectivos si eran impuestos en etapas tardías del llenado, entre los 27 y 46 días desde anthesis. Resultados similares en relación al momento del llenado donde se daría la regulación del nivel de dormición por el ambiente térmico fueron reportados por Rodríguez et al. (2001) en cebada. Sin embargo, resultados recientes asociaron zonas de producción con ambientes de altas temperaturas con una menor dormición de los frutos de girasol a cosecha (Lachabrouilli et al., 2021) pero en interacción con bajos niveles de precipitación, lo que podría estar interfiriendo con los efectos del ambiente térmico.

En relación a la escasa evidencia disponible sobre el efecto del ambiente durante el desarrollo de los frutos y el nivel de dormición en frutos de girasol, los reportes que existen se han concentrado casi con exclusividad en el estudio de los efectos del ambiente térmico, tal como se evidenció en el párrafo anterior. Sin embargo, se desconoce cómo influencia el aumento de temperatura durante el desarrollo de los frutos de girasol sobre su nivel de dormición en interacción con otros factores ambientales y los mecanismos subyacentes al fenómeno. Las variaciones en la FS también exponen a las plantas a cambios en el fotoperiodo y en la radiación incidente. Para ambos factores se han reportado efectos sobre el nivel de dormición en semillas de varias especies (Sánchez et al., 1981; Fenner, 1991; Gutterman, 2000). Por ejemplo, en quinoa se observó que fotoperiodos cortos durante la etapa de desarrollo del fruto se asociaron a un menor nivel de dormición a cosecha (Ceccato et al., 2011). El mismo efecto se reportó en otras especies (Karssen, 1970; Gutterman, 1974; Kigel et al., 1977; Gutterman, 1992; Contreras, 2007; Fernández Farnocchia et al., 2019). Sin embargo, en *Arabidopsis*, la



extensión del fotoperíodo ocasionó un efecto sutil sobre el nivel de dormición, que se disipa rápidamente luego de la dispersión de las semillas (Donohue et al., 2005). En el girasol, el fotoperíodo tampoco parecería ejercer un efecto significativo sobre la dormición. Es así que, en ensayos llevados a cabo en dos años consecutivos, Pizzorno (2021) no observó un efecto significativo sobre el nivel de dormición a cosecha de los frutos como resultado de haber expuesto a las plantas a una extensión artificial del fotoperíodo durante la etapa de desarrollo. En forma contraria al fotoperíodo, las variaciones en el nivel de radiación incidente en general disminuyen el nivel de dormición de las semillas, tanto en especies maleza, como de interés agrícola. Por ejemplo, en *Datura ferox* L. (Sánchez et al., 1981) y avena silvestre (Gallagher et al., 2013), reducciones artificiales de la radiación incidente de distintas magnitudes durante el período de desarrollo de las semillas produjeron una disminución significativa en la dormición de las semillas cosechadas. Por su parte, en soja, el sombreado generado en un intercultivo con maíz ocasionó semillas con mayor capacidad germinativa que las semillas provenientes de un sistema de monocultivo de soja (Chen et al., 2020). Frutos de girasol provenientes de plantas sometidas a un sombreado artificial de la radiación incidente al inicio del llenado de los mismos presentaron un mayor porcentaje de germinación a cosecha y durante la post-cosecha que los provenientes de un tratamiento sin sombreado (Pizzorno, 2021).

Las evidencias comentadas en los párrafos anteriores, en donde (i) una disminución del nivel de radiación y (ii) FS tardías que tienen una menor tasa de crecimiento determinan frutos con un menor nivel de dormición, sugieren la posibilidad de que cambios en la fuente de fotoasimilados pudiese estar involucrada en la regulación de la dormición de los frutos en girasol. De hecho, existen evidencias en varias especies que sugieren que variaciones en la fuente de asimilados, mediante sombreado, defoliaciones

y/o variaciones en la densidad de siembra, pueden afectar la capacidad germinativa de las semillas. Por ejemplo, en *Rumex crispus* la defoliación completa de las plantas al momento de la antesis produjo una reducción en el peso y tamaño de las semillas, así como un aumento en la velocidad de germinación (Maun y Cavers, 1971). Por su parte, en maíz se observó que defoliaciones a los 20 días desde la polinización generaron reducciones significativas en el peso unitario de la semilla, lo que generó un aumento en la velocidad de germinación de las semillas a 9°C (Frascaroli et al., 2005). En forma similar, en un trabajo en girasol donde se realizaron varios tratamientos manipulando la relación fuente destino (de ahora en más “FD”) mediante defoliaciones totales, parciales, remoción de semillas y variaciones en la densidad de siembra se observó que semillas más grandes, generadas mediante tratamientos de remoción de semillas en el capítulo y menores densidades de siembra, presentaron menor porcentaje y velocidad de germinación que las semillas pequeñas cuando fueron incubadas a 15°C (Saranga et al., 1998). A pesar de estas evidencias, aún no se visualiza claramente si los cambios en la FD durante el desarrollo de los frutos inciden sobre el nivel de dormición de los frutos de girasol a cosecha y durante la post-cosecha. Asimismo, no es claro si las manipulaciones en la relación FD podrían ser una de las causas que estarían explicando, al menos en parte, los efectos observados en la dormición del fruto ante variaciones en la FS.

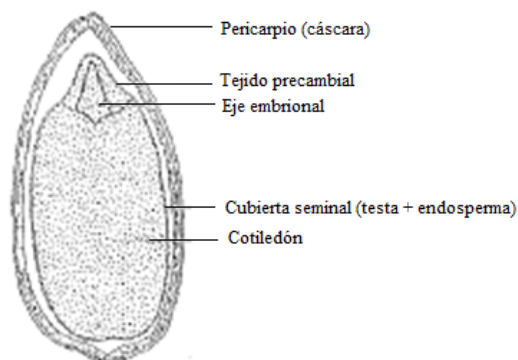
### 1.3. Dormición embrionaria e impuesta por las cubiertas (participación de las distintas estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición).

Baskin y Baskin (2004) clasifican a la dormición en tres tipos principales: *dormición morfológica* (cuando el embrión presenta cierto grado de inmadurez), *dormición física* (dada por una restricción que ejercen las cubiertas a la entrada de agua) y *dormición fisiológica* (dada por un mecanismo fisiológico que actúa sobre el embrión,

inhibiendo la protrusión de la radícula y pudiendo estar promovido por la acción de las cubiertas de las semillas y/o fruto). Asimismo, pueden existir modos combinados de dormición, como la *dormición morfofisiológica*, que se hace evidente en los casos de embriones que no están desarrollados (en tamaño, pero sí diferenciados) sumado a un componente fisiológico que contribuye a la dormición y la *dormición fisiológica+física*, donde los frutos o semillas combinan cubiertas impermeables con embriones fisiológicamente dormidos. La dormición fisiológica es la que se encuentra más frecuentemente entre las semillas de gimnospermas y angiospermas (Bewley et al., 2013) y es el tipo de dormición que presenta el girasol (Rodríguez et al., 2011). Este tipo de dormición puede estar impuesta al embrión, impuesta por las cubiertas, o por una combinación de ambas (Bewley et al., 2013). La dormición impuesta por las cubiertas se pone en evidencia cuando los embriones aislados germinan mientras que la semilla entera (o el fruto) no es capaz de germinar. Esto puede deberse a que las cubiertas podrían estar ejerciendo una restricción a la salida de inhibidores, al intercambio gaseoso, a la presencia de inhibidores en las cubiertas y/o imponiendo una restricción mecánica para la expansión del embrión. Por su parte, la dormición está impuesta por el embrión cuando se lo aísla de las cubiertas y permanece inhibido. Esto puede deberse a la presencia de inhibidores en el embrión que impiden su germinación (Bewley et al., 2013).

Para explicar este fenómeno en girasol, vale la pena aclarar que la “semilla” de girasol es en realidad un fruto compuesto por el pericarpo, derivado de la pared del ovario, la cubierta seminal (testa más restos de endosperma) y el embrión, que incluye el eje embrionario y los cotiledones (Fig. 1.1; de ahora en más, el término “cubiertas” hará referencia al pericarpo y a la cubierta seminal en conjunto). En función del momento de desarrollo y de post-maduración (es decir, condiciones de humedad y temperatura que garantizan la salida de dormición), los frutos de girasol

pueden presentar dormición impuesta por el embrión y/o dormición impuesta por las cubiertas (Corbineau et al., 1990; Brunick, 2007). En estadios tempranos del 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 la semilla madura (Le Page-Degivry y Garello, 1992).

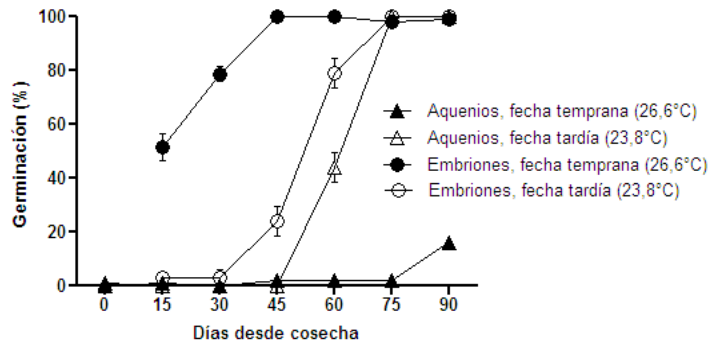


**Fig. 1. 1.** Sección longitudinal de un fruto de girasol. Extraído de Aguirrezábal y Pereyra (1998).

Así, la profunda dormición que los frutos de girasol presentan a cosecha resulta de la coexistencia de dormición impuesta por las cubiertas, y un remanente de dormición embrionaria (Corbineau et al., 1990; Lachabrouilli et al., 2021). La dormición embrionaria generalmente se pierde rápidamente durante el almacenaje en seco, mientras que la dormición impuesta por las cubiertas persiste por más tiempo y puede llegar a requerir varios meses para revertirse (Corbineau et al., 1990; Bianco et al., 1994; Benech-Arnold, 2004). Aun cuando existen algunos trabajos que han intentado determinar el aporte que hacen los distintos tejidos que componen las cubiertas (pericarpio y cubierta seminal) a la dormición del fruto de girasol, los resultados obtenidos no han sido concluyentes, ya que éstos parecen depender del genotipo. Por ejemplo, Domínguez et al. (2016) evaluó un material que expresaba dormición a alta temperatura (25 y 30°C) donde se observó que la dormición estaba mayormente impuesta por el pericarpio. En forma contraria, resultados aportados por Rollestek et al. (2007) mostraron que en el genotipo

estudiado por estos autores la dormición era explicada en mayor medida por la cubierta seminal. Por último, en trabajos realizados por Bodrone et al. (2017), donde se evaluó la dormición en frutos expuestos a altas temperaturas durante su desarrollo, se observó que la dormición de los frutos expuestos a altas temperaturas era explicada en mayor medida por la cubierta seminal, mientras que en el tratamiento control, ésta era explicada en mayor medida por el pericarpo. Estos resultados sugieren que las cubiertas que estarían imponiendo la dormición no dependerían sólo del genotipo, sino también del ambiente en el cual se desarrollaron y maduraron los frutos.

En la literatura existen trabajos que han estudiado el efecto del ambiente durante la etapa de desarrollo de los frutos sobre el nivel de dormición y su relación con las estructuras del fruto (embrión y cubiertas) que contribuyen a dicho nivel de dormición. Por ejemplo, en quinoa (*Chenopodium quinoa*), plantas creciendo en FS tardías presentaron cubiertas seminales más delgadas que las que crecieron en FS tempranas (Ceccato et al., 2015). Esta diferencia anatómica se asoció a un menor nivel de dormición impuesto por las cubiertas. En el cultivo de girasol, Bodrone et al. (2017) observaron que ambientes de mayores temperaturas durante la etapa de desarrollo del fruto, como FS tempranas y tratamientos artificiales de alta temperatura, se asociaron con un mayor nivel de dormición impuesto por las cubiertas y una menor dormición embrionaria (Fig. 1.2). Existen trabajos donde se ha detectado que variaciones en el AM ejercen un efecto sobre el nivel de dormición de las semillas a través de cambios en características estructurales, morfológicas y de composición química de las cubiertas (Penfield y MacGregor, 2017). Por ejemplo, en *Chenopodium bonus-henricus*, las semillas presentan mayor dormición a medida que se desarrollan en altitudes más elevadas, donde la temperatura es menor y el nivel de radiación es mayor con el aumento de la elevación. Esta inhibición de la germinación está



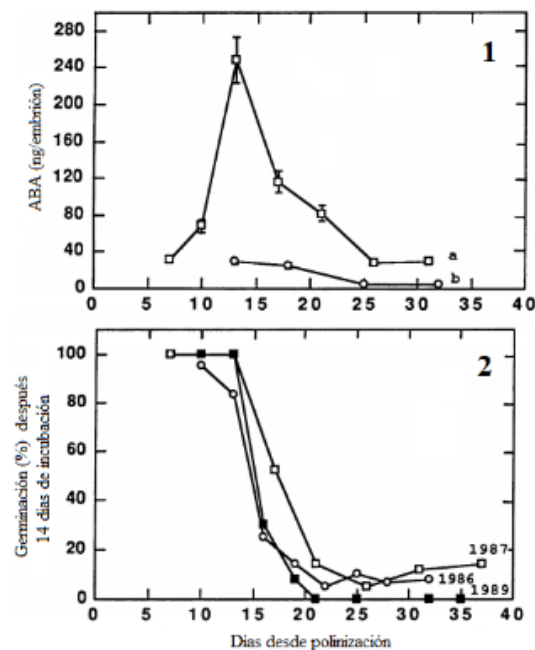
**Fig. 1. 2.** Porcentaje de germinación a 11°C de incubación en función de los días desde cosecha, de achenes (triángulos) y embriones (círculos) de girasol (*Helianthus annuus* L.) provenientes de la FS temprana (símbolos oscuros) y tardía (símbolos claros). Las barras indican EE. Los valores entre paréntesis en la referencia indican la temperatura media de 10 a 18 horas para todo el período de desarrollo del fruto. Durante la post-cosecha, los achenes se mantuvieron almacenados a 25°C en seco. Extraído de Bodrone (2014).

asociada al engrosamiento de las cubiertas y al mayor contenido de fenoles, que reducen la permeabilidad al agua y a los gases (Dorne, 1981; Weidner et al., 1996, 1999; Debeaujon et al., 2000). En girasol, la disminución de la radiación incidente durante el desarrollo de los frutos provocó una disminución de la dormición impuesta por las cubiertas, asociada a un pericarpo más fino (Pizzorno, 2021), sin observarse diferencias en el espesor de la cubierta seminal. Sin embargo, no se observaron variaciones en el contenido de fenoles de las cubiertas asociadas a los cambios en el nivel de dormición (Pizzorno, comunicación personal). Un efecto similar del sombreado sobre la anatomía del pericarpo fue reportado por Lindström et al. (2007), quienes coincidieron con que el sombreado durante la post-antesis produce pericarpos más livianos y delgados, asociado tanto a una reducción de las paredes celulares como al número de células de la capa media del pericarpo en los frutos pertenecientes a las tres posiciones del capítulo. Más allá de estas evidencias, aún se desconoce cómo los factores ambientales afectan los distintos componentes que determinan la dormición del fruto (pericarpo, cubierta seminal y/o embrión) durante su etapa de desarrollo, y cuál sería la relación existente entre estos cambios y los mecanismos responsables de la imposición de la dormición en los frutos de girasol.

#### 1.4. Control hormonal de la dormición.

Los efectos de las señales ambientales y la expresión del nivel de dormición en semillas de un gran número de especies se encuentran mediados, al menos en parte, por las hormonas vegetales ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GAs) (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein et al., 2008), que inhiben y promueven la germinación, respectivamente. Según la teoría del balance hormonal, los efectos relativos del ABA (efecto inhibitorio), y de las GAs (efecto promotor) son los principales determinantes del nivel de dormición y la germinación de las semillas. Los efectos relativos de estas hormonas dependen de las cantidades presentes en las semillas, que a su vez dependen de las tasas de síntesis y catabolismo, así como de la sensibilidad de los tejidos al efecto de las mismas, dependientes de la percepción y la transmisión de la señal (Finkelstein et al., 2008). El ABA es un regulador positivo, tanto de la inducción, como del mantenimiento de la dormición (Bewley, 1997). Gran parte de esta evidencia surge de trabajos con mutantes de diferentes especies. Por ejemplo, mutantes de *Arabidopsis*, maíz y tomate deficientes en ABA o insensibles a la hormona, producen semillas que presentan germinación precoz o viviparismo (Bewley, 1997). A su vez, la aplicación de inhibidores de la síntesis de ABA determina la pérdida de la dormición de semillas en desarrollo de varias especies (Le Page-Degivry et al., 1990; Xu et al., 1990; Steinbach et al., 1997). En relación a la imposición de la dormición durante el desarrollo, existe evidencia de que estaría determinada por la producción de ABA por parte del embrión. Generalmente, se ha observado que la acumulación de ABA comienza temprano en el desarrollo, luego alcanza un máximo, y finalmente desciende hacia el final del período de desarrollo de la semilla. En muchas especies, ese pico de máxima acumulación de ABA es el responsable de la inducción de la dormición primaria, como en arroz (Gu et al., 2010) y alfalfa (Xu et al., 1990; Xu y Bewley, 1991). En girasol los embriones aislados

germinan en un 100% hasta aproximadamente los 15 días desde la polinización, momento en el que ocurre el pico máximo de contenido endógeno de ABA. A partir de allí, el porcentaje de germinación de los embriones disminuye abruptamente para permanecer dormidos en estadios posteriores (Le Page-Degivry et al., 1990). Sin embargo, la aplicación de un inhibidor de la síntesis de ABA (*fluridone*, Le Page-Degivry et al., 1990; Le Page-Degivry y Garello, 1992; Bianco et al., 1994; Steinbach et al., 1997; Grappin et al., 2000; Ali-Rachedi et al., 2004; Argyris et al., 2008; Huo y Bradford, 2015) durante el desarrollo de los frutos determinó una disminución significativa del nivel endógeno de ABA durante el desarrollo, impidiendo la inducción de la dormición primaria de los embriones (es decir, los embriones presentaron un alto porcentaje de germinación, Fig. 1.3; Le Page-Degivry et al., 1990). Estos resultados sugieren fuertemente que la imposición de la dormición requiere de un aumento del nivel endógeno de ABA durante el desarrollo de las semillas y que la deficiencia de ABA durante esta etapa estaría asociada con una ausencia de dormición primaria en la semilla madura (Nambara y



**Fig. 1. 3.** 1. Contenido endógeno de ABA en función de los días de polinización para semillas de girasol del tratamiento control (a) y semillas tratadas con fluridone al 8vo día desde polinización (b). Cada punto corresponde a la media de 8 estimaciones individuales con su respectivo EE. 2. Germinación de embriones luego de 14 días de incubación en función de los días desde polinización, para tres años distintos. Extraído de Le Page-Degivry et al. (1990).



Marion-Poll, 2003). En el caso del girasol, el nivel endógeno de ABA no sólo impone la dormición, sino que también es el responsable de su mantenimiento. Le Page-Degivry y Garello (1992) evaluaron la participación de la síntesis *de novo* de ABA durante la incubación por 24 horas en presencia o ausencia de fluridone en embriones inmaduros de girasol. Los resultados mostraron que la inhibición de la síntesis de ABA por la aplicación de fluridone determinó un aumento en la germinación de los embriones en relación a la germinación de los embriones incubados en agua. Este aumento en la germinación estuvo relacionado con una disminución del contenido endógeno de ABA de los ejes embrionarios a las 24 horas de incubación como resultado de la aplicación del inhibidor de síntesis, mientras que los ejes embrionarios de embriones incubados en agua aumentaron su nivel endógeno de ABA (Cuadro 1.1). Los resultados que obtuvieron demuestran que la supresión de la síntesis de ABA en los ejes embrionarios induce la germinación, poniendo en evidencia el requerimiento de síntesis *de novo* de ABA por parte de los embriones para mantener el nivel de dormición durante el desarrollo (Le Page-Degivry y Garello, 1992).

**Cuadro 1.1.** Cambios en el contenido de ABA de ejes embrionarios de 26 días desde antes que fueron incubados con y sin la presencia de fluridone en el medio de incubación. Además, se presenta la germinación de los embriones. Extraído de Le Page-Degivry y Garello (1992).

		ABA en eje (pg)	Germinación embriones (%)
<i>Antes de la incubación</i>		177 ± 18	
<i>24 horas de incubación</i>			
Embriones	Sin fluridone	290 ± 29	25
	Con fluridone	ND	100

Como fue mencionado anteriormente, las GAs presentan un rol antagónico al ABA y actúan como promotoras de la germinación. Este efecto está dado a través de mecanismos relacionados con la inducción de enzimas hidrolíticas que debilitan los tejidos que funcionan como “barreras” a la extrusión de la radícula, promoviendo la removilización de reservas, y estimulando la expansión del embrión (Bewley et al., 2013).

Aunque la acumulación de GAs se asocia comúnmente con la promoción de la germinación, el rol de las GAs en la liberación de la dormición es controversial (Finkelstein et al., 2008). Por ejemplo, semillas dormidas de *Arabidopsis* (ecotipo Cvi) disminuyen su dormición durante la post-maduración en seco a 20°C, cuando se estratifican a 4°C o cuando se inhibe la biosíntesis de ABA. Sin embargo, la aplicación exógena de GAs no las despierta completamente, por el contrario, genera un aumento transitorio en la concentración de ABA, sugiriendo que en semillas dormidas de *Arabidopsis* debe existir un mecanismo de retroalimentación que mantiene alta la relación ABA/GA (Ali-Rachedi et al., 2004). En cereales, se observó que el ABA y las GAs actúan antagónicamente en la inducción de la dormición durante el desarrollo temprano. La inhibición de la síntesis de GAs en panojas inmaduras de sorgo reduce el contenido endógeno de GAs durante el desarrollo y retrasa la salida de la dormición en una línea considerada con poca dormición a cosecha (Steinbach et al., 1997). Mientras que la inducción y el mantenimiento de la dormición depende de altas relaciones ABA/GAs, la salida de la dormición resulta en un aumento de la biosíntesis de GAs y de la degradación de ABA, resultando en una baja relación ABA/GA (Steinbach et al., 1997; Benech-Arnold et al., 1999; White et al., 2000; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Seo et al., 2009). Sin embargo, en girasol, Roselló et al. (2016) no encontraron diferencias en el contenido endógeno de GA1 y GA3 en embriones de genotipos de girasol con dormición contrastante; las diferencias en dormición estuvieron asociadas a variaciones en el contenido endógeno de ABA.

En adición a los cambios en el contenido endógeno de hormonas, la transición de un estado “dormido” a “no dormido” está caracterizada en muchas especies por una disminución en la sensibilidad al efecto inhibitorio del ABA y a un aumento en la sensibilidad al efecto promotor de las GAs (Le Page-Degivry et al., 1996; Corbineau et

al., 2002; Leubner, 2002). La sensibilidad al ABA se adquiere durante algún momento en el desarrollo de la semilla, y se va perdiendo durante la maduración, tal como se evidencia en embriones de alfalfa (Xu y Bewley, 1991). En cereales, el nivel de dormición está asociado, en buena medida, con la sensibilidad que presentan los embriones al efecto inhibitorio del ABA (Walker-Simmons, 1987; Benech-Arnold et al., 1999). En lechuga, por ejemplo, bajo altas temperaturas de incubación, las semillas no solo aumentan su contenido de ABA, sino que también se ve aumentada su sensibilidad al ABA (Contreras, 2007). En el girasol, Le Page-Degivry et al. (1996) observaron que los embriones de esta especie pierden la sensibilidad al ABA a medida que disminuyen su nivel de dormición durante la post-maduración. En cuanto a las GAs, el aumento en la sensibilidad de los embriones a la GAs en etapas finales del desarrollo ocurre, pero solo una vez que la capacidad de síntesis de ABA y la sensibilidad al ABA disminuyen significativamente (Le Page-Degivry et al., 1996). Por su parte, Rodríguez et al. (2018) observaron que, durante la post-maduración a 25°C, tanto los frutos como los embriones pierden progresivamente la sensibilidad al ABA. Además del papel fundamental que juegan el ABA y las GAs en la regulación del nivel de dormición, otras hormonas también estarían involucradas en dicha regulación, como el etileno, las auxinas, las citoquininas y los brasinoesteroides; aunque muchas de estas hormonas actuarían a través de su interacción con las vías de señalización del ABA y las GAs (Feurtado y Kermode, 2007). Por ejemplo, el etileno promovería la terminación de la dormición a través de la atenuación de la señalización del ABA y del nivel endógeno de ABA (Finkelstein et al., 2008; Matilla y Matilla-Vázquez, 2008). En girasol, Corbineau et al. (1990) reportaron que la aplicación exógena de etileno estimuló la germinación de frutos y embriones inmaduros que presentaban un alto nivel de dormición. Además, encontraron que varios inhibidores de

la biosíntesis o de la acción del etileno inhibieron marcadamente la germinación de embriones que no presentaban dormición.

En relación a los efectos del AM sobre los mecanismos hormonales de control de la dormición, existen algunas evidencias en especies como *Arabidopsis*, lechuga y girasol. En *Arabidopsis*, bajas temperaturas (15°C) durante el desarrollo de las semillas generaron un aumento en el nivel de dormición con respecto a semillas creciendo en un ambiente de 22°C, asociado con un mayor y menor contenido endógeno de ABA y GA4 (la GA activa en semillas de *Arabidopsis*), respectivamente (Kendall et al., 2011). Asimismo, semillas de lechuga que presentaron un menor nivel de dormición por provenir de plantas creciendo en ambientes de mayor temperatura (20–30°C, 12–12hs) presentaron menor sensibilidad al ABA que las semillas provenientes de plantas creciendo en un ambiente de menor temperatura (20–10°C, 12–12hs) y que presentaban un mayor nivel de dormición. Sin embargo, en este experimento no se encontraron diferencias significativas en el contenido endógeno de ABA en semillas maduras provenientes de ambos ambientes térmicos (Contreras, 2007). En el caso de girasol, Bodrone et al. (2017) encontraron que frutos expuestos a ambientes de mayor temperatura durante el período de desarrollo del fruto tenían un mayor nivel de dormición que aquellos expuestos a menores temperaturas, asociado a frutos más sensibles a la inhibición de la germinación por ABA. Por su parte, Pizzorno (2021) reportaron que los frutos a cosecha provenientes de un tratamiento sombreado durante el período de desarrollo del fruto y que tenían un menor nivel de dormición en comparación a un control sin sombrear, presentaron un menor contenido de ABA, sin observar un efecto diferencial entre los tratamientos de AM sobre la síntesis de GAs de novo, mediante el uso de inhibidores de síntesis de la hormona. Los resultados comentados en relación a la regulación hormonal de la dormición en frutos de girasol no son concluyentes y muchos aspectos relacionados a los posibles mecanismos a través de

los cuales el AM estaría afectando el nivel de dormición en frutos de girasol, y como se impondría esta regulación durante el desarrollo de los mismos aún se desconoce. Es más, en girasol es aún difuso el conocimiento de los mecanismos que operan en la imposición de dormición en el fruto entero; particularmente, se desconoce si la presencia de las cubiertas podría estar afectando el metabolismo y/o la señalización hormonal en el embrión, y cómo interactúan estos componentes del fruto con el ambiente explorado durante el desarrollo de los frutos. Alternativamente, otros posibles cambios en estos mecanismos que impactan en la dormición podrían estar determinados por una disminución del nivel de oxígeno en el embrión dentro del fruto embebido por efecto del pericarpo (Rodríguez et al., 2015). Se ha propuesto que la presencia de las cubiertas podría afectar la actividad hormonal (es decir, el contenido endógeno de ABA y la respuesta al ABA exógeno) a través del control del nivel de oxígeno en el embrión, y así modular la expresión de la dormición (Lenoir et al., 1986). El nivel de oxígeno es bajo en embriones de semillas en desarrollo de muchas especies, entre ellos el girasol (Borisjuk y Rolletschek, 2009) y podría estar implicado en la expresión de la dormición impuesta por las cubiertas. De hecho, en girasol se ha observado que a altas temperaturas de incubación (30°C) tanto la germinación de frutos como la de embriones se ve restringida ante disminuciones crecientes en la disponibilidad de oxígeno y que este mecanismo estaría determinado, al menos en parte, por un aumento de la sensibilidad al ABA de los embriones en condiciones de hipoxia (Domínguez et al., 2019). 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; Fedi et al., 2017) y en cebada (Benech-Arnold et al., 2006). La posibilidad de que factores del AM actúen sobre la dormición de los frutos de girasol a través de cambios en las cubiertas es sustentada por trabajos que muestran cambios estructurales en el

pericarpo de girasol bajo diferentes ambientes de cultivo, como los realizados por Lindström et al. (2007), Franchini et al. (2010) y Pizzorno (2021).

En el presente trabajo de tesis se propuso abordar en forma integrada y en distintos genotipos de girasol los efectos del AM sobre los mecanismos que regulan el nivel de dormición de los frutos, teniendo en cuenta la función de las distintas estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición y la regulación hormonal, particularmente aquellos relacionados con el efecto del ABA; hormona que, según las evidencias reportadas, sería la responsable de la imposición del nivel de dormición primaria en esta especie (Le Page-Degivry et al., 1996). Comprender este tipo de asociaciones aportará conocimiento respecto a los mecanismos fisiológicos (hormonales y estructurales) a través de los cuales las variables ambientales regulan los cambios en el nivel de dormición en esta especie. Además, se exploró la posibilidad de que parte de los efectos maternos que puedan afectar el nivel de dormición de los frutos a cosecha sean explicados por variaciones en la disponibilidad de recursos (variaciones del nivel de radiación y de la relación FD) durante el desarrollo del fruto. En paralelo se exploraron parte de los mecanismos que podrían estar por detrás de esta regulación, un aspecto escasamente abordado en la bibliografía. Avanzar sobre estos aspectos resulta indispensable si se pretende comprender cómo el ambiente (zona de producción y FS) regula la dormición en el cultivo de girasol. Los resultados de estas tesis no solo brindan información en relación a los mecanismos fisiológicos implicados en la regulación por el AM, sino que, además, el conocimiento aportado por esta tesis resulta útil para los productores de semillas en la toma de decisiones en relación a estrategias de manejo agronómico (FS, densidad de siembra, elección del genotipo, disponibilidad de recursos, etc.) para obtener lotes de semilla de alta calidad de acuerdo al objetivo de producción.

## **OBJETIVOS**

**Objetivo general:** Investigar los efectos del AM sobre la dormición en frutos de girasol y determinar los mecanismos fisiológicos involucrados en dicha regulación.

**Objetivos específicos**

1. Evaluar y cuantificar el efecto de cambios en la FS sobre el nivel de dormición a cosecha y la salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha en una gama amplia de genotipos de girasol. En función de los resultados obtenidos identificar genotipos que presenten cambios significativos en el nivel de dormición ante variaciones en la FS.
2. Utilizando los genotipos seleccionados en 1, evaluar y cuantificar el efecto de (i) cambios en la FS, (ii) variaciones en la temperatura, y (iii) cambios en la relación FD, sobre las variaciones en el nivel de dormición de los frutos de girasol durante su etapa de desarrollo en la planta madre, el nivel de dormición a cosecha y la salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha.
3. Para los distintos tratamientos evaluados en 2, determinar (i) en qué medida los efectos observados sobre el nivel de dormición se deben a cambios en la dormición impuesta por las cubiertas y/o a cambios en la dormición embrionaria, (ii) las vías hormonales implicadas en la regulación del nivel de dormición (particularmente aquellas ligadas al ABA), (iii) cambios en las propiedades anatómicas de las cubiertas de los frutos asociados a los cambios observados en dormición, (iv) cambios en la capacidad de las estructuras del fruto para germinar en hipoxia (sensibilidad a hipoxia).
4. A partir de la concreción de los objetivos anteriores, proponer mecanismos fisiológicos que expliquen los cambios en el nivel de dormición que experimentan los frutos de girasol en respuesta al AM.

**HIPÓTESIS**

1. Atrasos en la FS determinan un menor nivel de dormición de los frutos a cosecha y una mayor velocidad de salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha en una amplia gama de genotipos de girasol.

2. La temperatura explorada por las plantas durante el desarrollo de los frutos afecta el nivel de dormición de los mismos a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha.

*Predicción:* Bajas temperaturas determinan frutos con un menor nivel de dormición.

3. La temperatura experimentada durante la etapa de desarrollo de los frutos ejerce un efecto diferencial sobre los componentes embrionarios y por cubiertas de la dormición en frutos de girasol.

*Predicción:* Aumentos en la temperatura media diaria durante el desarrollo de los frutos determinan una mayor dormición impuesta por cubiertas y una menor dormición embrionaria.

4. Los cambios en la relación FD que experimentan los frutos de girasol durante su etapa de desarrollo afectan el nivel de dormición de los mismos.

*Predicción:* Disminuciones en la fuente durante la etapa de desarrollo de los frutos determinan un menor nivel de dormición de los frutos y *viceversa*.

5. Los efectos del AM sobre la dormición del fruto están asociados a cambios en la sensibilidad al ABA y GAs y/o en el metabolismo de ABA de los embriones durante la etapa de desarrollo de los frutos.

*Predicción:* Tratamientos que determinan un menor nivel de dormición de los frutos están asociados a un menor contenido endógeno de ABA, una menor capacidad de síntesis de ABA *de novo* en los embriones, una menor sensibilidad al efecto inhibitorio del ABA de los embriones, y a una mayor sensibilidad a las GAs.

6. Los efectos del AM sobre la dormición impuesta por cubiertas están asociados a cambios en las características anatómicas de las mismas.



*Predicción:* Tratamientos que determinan un menor nivel de dormición de los frutos están asociados a un menor espesor de las cubiertas (pericarpo).

7. Los cambios en el nivel de dormición del fruto por efecto de cambios en el AM están asociados a cambios en la sensibilidad a la hipoxia de los embriones.

*Predicción:* Tratamientos que determinan un menor nivel de dormición de los frutos están asociados a una menor sensibilidad de los embriones a concentraciones decrecientes de oxígeno.

### **ESTRUCTURA DE LA TESIS**

La presente tesis se estructura en seis capítulos. El capítulo 1 (Introducción General) plantea la problemática de la dormición en frutos de girasol, presenta el marco teórico existente en función de la información bibliográfica y enuncia los objetivos e hipótesis del trabajo. Los capítulos 2 (Fechas de siembra tardías reducen el nivel de dormición en girasoles cultivados y silvestres), 3 (Efecto de la fecha de siembra sobre el nivel de dormición en frutos de girasol. Estudio de los mecanismos fisiológicos involucrados), 4 (Efecto del ambiente térmico explorado durante la etapa de desarrollo del fruto en la planta madre sobre el nivel de dormición en frutos de girasol) y 5 (Efecto de manipulaciones en la relación fuente destino durante la etapa de desarrollo del fruto en la planta madre sobre el nivel de dormición en frutos de girasol) comprenden los resultados experimentales derivados de esta tesis, junto con su respectiva introducción, materiales y métodos, resultados y discusión. Finalmente, en el capítulo 6 (Discusión General) se contrastan las hipótesis planteadas en el capítulo 1, se discuten los resultados de manera conjunta y vinculada en un enfoque fisiológico, ambiental y agronómico, se concluyen los aportes de esta tesis y se comentan las implicancias para futuras investigaciones. En la sección Suplementaria se encuentran figuras, cuadros y notas suplementarias a los capítulos de resultados 2, 3, 4, 5 y 6.

## **CAPÍTULO 2. Fechas de siembra tardías reducen el nivel de dormición en girasoles cultivados y silvestres**

### **2.1. Introducción**

La FS es una de las decisiones agronómicas más relevantes en los sistemas de producción de cultivos (Balalić et al., 2012). Esta práctica establece las condiciones ambientales que experimentan las plantas durante su ciclo, provocando variaciones significativas en la fenología, la acumulación de biomasa, el rendimiento y la calidad de las semillas (Andrade, 1995; de la Vega y Hall, 2002a). En cuanto a este último carácter, la FS establece el AM que explorarán los frutos durante su desarrollo afectando, dentro de otros rasgos, el nivel de dormición de los mismos (Roach y Wulff, 1987; Fenner 1991; Fernández Farnocchia et al., 2019, 2021). Estos niveles están relacionados con la amplitud del rango térmico para que ocurra la germinación, es decir, cuanto más bajo es el nivel de dormición, más amplio es el rango térmico en el que las semillas pueden germinar y *viceversa*. Los cambios en el rango térmico se han utilizado para cuantificar los cambios en el nivel de dormición de las poblaciones de semillas en diversas especies, que provienen de diversos AM (Batlla y Benech-Arnold, 2015; Fernández Farnocchia et al., 2019, 2021). Por ejemplo, en quinoa (*Chenopodium quinoa*) y cebada, FS tempranas determinaron un mayor nivel de dormición de las semillas que FS tardías (Rodríguez et al., 2001; Gualano y Benech -Arnold, 2009; Ceccato et al., 2011; González et al., 2019). En girasol, Bodrone et al. (2017) y Pizzorno et al. (2014) observaron que los frutos de un híbrido comercial y una línea parental, respectivamente, sembrados en una FS temprana presentaron un mayor nivel de dormición a cosecha y requirieron un período de almacenaje post-cosecha más prolongado para aliviar esa dormición, en comparación con los frutos provenientes de FS tardías. Estas evidencias sugieren que la FS podría ser una herramienta para reducir el nivel de dormición de las semillas a cosecha en lotes

destinados a la producción de semillas. Sin embargo, salvo en los trabajos mencionados, no hay información suficiente para evaluar si la respuesta al atraso en la FS sobre el nivel de dormición es común a la mayoría de los genotipos de girasol, y en qué medida la magnitud de dicha respuesta varía entre genotipos.

Los cambios en las condiciones ambientales que experimenta la planta madre durante el desarrollo del fruto como consecuencia de cambios en la FS pueden afectar de manera diferencial a los componentes del fruto que imponen la dormición (es decir, la dormición impuesta por las cubiertas o por el embrión). Por ejemplo, los frutos de girasol provenientes de FS tempranas incubados a bajas temperaturas presentaron una dormición embrionaria menor y una dormición impuesta por cubiertas mayor, que frutos provenientes de FS tardías (Bodrone et al., 2017). Una respuesta similar se observó en quinoa, donde una menor dormición impuesta por el pericarpo en frutos cosechados en FS tardías se asoció con un pericarpo más fino (Ceccato et al., 2015). Estas evidencias demuestran el impacto del AM sobre la contribución de las distintas estructuras a la dormición del fruto entero. Sin embargo, aún se desconoce cómo los cambios en la FS afectan la expresión de la dormición a diferentes temperaturas de incubación y cómo esto último se combina con la contribución de las cubiertas o del embrión en la determinación del nivel de dormición del fruto entero.

En el presente capítulo se investigó el efecto de FS sobre la dormición en frutos de girasol en una amplia gama de genotipos, en tres años. Además, se indagó si los cambios en el nivel de dormición de los frutos, por efecto de cambios en la FS se asociaron a cambios en la contribución de las cubiertas o del embrión a la dormición del fruto entero y/o a cambios en la temperatura a la que se expresa la dormición.

## **2.2. Materiales y métodos**

### 2.2.1. Sitio de los ensayos, tratamientos y material vegetal.

En el experimento I se cultivaron 20 genotipos (Cuadro 2.1) en dos FS contrastantes (temprana vs. tardía) en tres años consecutivos: en 2015/2016 – Año 1: 17 de septiembre (FS temprana) y 3 de diciembre (FS tardía); en 2016/2017 – Año 2: 3 de septiembre (FS temprana) y 4 de enero (FS tardía); y en 2017/2018 – Año 3: 10 de octubre (FS temprana) y 4 de enero (FS tardía). El material vegetal consistió en diferentes líneas endocriadas o cultivares de girasol y tres poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* recogidas en la Argentina (Cuadro 2.1). En la selección de los genotipos se buscó que presenten un alto nivel de dormición a cosecha. A su vez, se incluyeron algunos materiales de baja dormición para ver respuestas contrastantes. La información del comportamiento de los materiales basó en algunos casos de información publicada (Cantamutto et al., 2010; Presotto et al., 2014; Andrade et al., 2015; Roselló et al., 2016; Vigliocco et al., 2017), en información de los mejoradores que nos brindaron la semilla y en caracteres fenotípicos de los frutos que pondrían tener alguna relación con la dormición (por ejemplo, tamaño de semilla, relación pepita pericarpo, y color estructura del pericarpo). En el experimento II, el genotipo 1579 fue sembrado en cinco FS escalonadas durante un período de 5 meses en la campaña 2016/2017: 1° de septiembre, 3 de octubre, 1° de noviembre, 1° de diciembre y 4 de enero. Los experimentos se realizaron en el campo experimental de la Cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (34°25' S, 58°25' O).

### 2.2.2. Condiciones generales de los ensayos a campo.

**Cuadro 2. 1.** Nombres y orígenes de los genotipos estudiados. PN y C indican si los genotipos proceden de poblaciones naturalizadas o de líneas cultivadas, respectivamente. Los años 1, 2 y 3 fueron las estaciones de crecimiento en las que se evaluaron los genotipos. Material vegetal proporcionado por: <sup>1</sup>Ing. Agr. Dr. Alejandro Presotto e Ing. Agr. Dr. Miguel Cantamutto, Universidad Nacional del Sur; <sup>2</sup>Ing. Agr. Julio González, INTA Pergamino; <sup>3</sup>Ing. Agr. MSc Daniel Álvarez, INTA Manfredi; y <sup>4</sup>Ayerza Semillas S.A.

<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>
<b>AAL</b> (PN, Año 1) <sup>1</sup>	Adolfo Alsina, Buenos Aires (S 37°16', O 62°59')
<b>BAR</b> (PN, Año 1) <sup>1</sup>	Colonia Barón, La Pampa (S 36°10', O 63°53')
<b>LMA</b> (PN, Año 1) <sup>1</sup>	Las Malvinas, Mendoza (S 34°47', O 68°15')
<b>EC</b> –Estriado Común (C, Año 1) <sup>4</sup>	Ruso
<b>GOR</b> –Gigante Ruso (C, Año 2) <sup>4</sup>	Ruso
<b>HA342</b> (C, Año 2) <sup>3</sup>	USDA línea pública
<b>HA89</b> (C, Años 1, 2) <sup>2</sup>	USDA línea pública
<b>B123</b> (C, Año 3) <sup>3</sup>	INTA Manfredi
<b>B91</b> (C, Año 3) <sup>3</sup>	INTA Manfredi
<b>581</b> (C, Año 2) <sup>2</sup>	Ruso X USDA Dakota del Norte
<b>591</b> (C, Año 2) <sup>2</sup>	Ruso X USDA Dakota del Norte
<b>600</b> (C, Año 2) <sup>2</sup>	Ruso X USDA Dakota del Norte
<b>601</b> (C, Año 2) <sup>2</sup>	INTA Pergamino X HA300 (USDA línea pública)
<b>608</b> (C, Año 2) <sup>2</sup>	INTA Pergamino
<b>609</b> (C, Años 1, 2) <sup>2</sup>	INTA Pergamino
<b>1552</b> (C, Años 1, 2, 3) <sup>2</sup>	USDA línea pública
<b>1575</b> (C, Año 2) <sup>2</sup>	USDA Dakota del Norte
<b>1579</b> (C, Años 1, 2, 3) <sup>2</sup>	USDA Dakota del Norte
<b>1673</b> (C, Año 2) <sup>2</sup>	USDA Dakota del Norte X Ruso
<b>1679</b> (C, Año 2) <sup>2</sup>	USDA Dakota del Norte X Ruso

En el experimento I, la parcela experimental se dividió en dos parcelas principales donde se asignó, en cada una de ellas, el tratamiento “fecha de siembra” (temprana o tardía). Dentro de cada parcela, los genotipos se asignaron al azar en microparcels de 3 surcos de 10m cada uno, utilizando una densidad de 5 plantas m<sup>-2</sup> y una distancia de 52 cm entre filas. En el experimento II, la parcela se dividió en 5 parcelas de 6 surcos de 10m cada uno, a las que se asignaron aleatoriamente cada una de las cinco FS, utilizando la misma densidad y distancia entre surcos que en el experimento I.

Se registraron las etapas ontogenéticas de cada planta individual desde R1 hasta R6 (Schneiter y Miller, 1981). En R4, cada capítulo se cubrió con una bolsa de poliamida para evitar el intercambio de polen entre los diferentes genotipos. Las plantas se polinizaron manualmente. El momento de madurez de cosecha (de ahora en más “MC”) ocurrió cuando el contenido de humedad del fruto alcanzó el 11% (en base húmeda). En

este momento, los capítulos de plantas que no difirieron en más de dos días de su etapa de antesis media (R5.5, Schneiter y Miller, 1981; de ahora en más, este momento de la fenología del cultivo será mencionado como “Antesis”) fueron cosechados y trillados manualmente. Únicamente los frutos del tercio medio del capítulo fueron seleccionados y secados en una secadora experimental con aire forzado a 35°C hasta alcanzar un contenido de humedad del 6% (Bodrone et al., 2017); el proceso desde la MC (11%) hasta el 6% de humedad duró, en promedio, 7 días. Después del secado, los frutos se almacenaron a 25°C en una atmósfera seca dentro de bolsas de plástico herméticas y se tomaron submuestras regularmente para realizar los ensayos de germinación.

Las plantas se fertilizaron con fósforo a la siembra y con nitrógeno en V4, y se regaron mediante un sistema de riego por goteo. Se aplicaron fungicidas e insecticidas para mantener la sanidad. Los datos meteorológicos fueron registrados por una estación meteorológica ubicada en el sitio experimental (Davis Vantage Pro2).

Adicionalmente, en el experimento II se monitoreó la dinámica del llenado y secado de los frutos en la planta madre. Los frutos fueron muestreados en el centro medio de tres capítulos por FS desde los 7 días desde R5.5 hasta la cosecha. Los mismos se pesaron antes y después de secarlos por 90 minutos a 130°C, estimando así el peso seco (mg) y la humedad de los frutos (%). El momento de madurez fisiológica (de ahora en más, “MF”) se estableció cuando se registraron al menos 3 puntos con similar peso seco del fruto. En este experimento (II), a su vez, se determinó el rendimiento por planta (g planta<sup>-1</sup>) usando 3 plantas por FS.

### 2.2.3. Ensayos de germinación.

Los ensayos de germinación se realizaron a cosecha (de aquí en más, cuando se describe la germinación a “cosecha”, se hace referencia a la germinación de los frutos

luego del secado a 6%) y a intervalos de 30 a 50 días durante el almacenaje post-cosecha. Se colocaron 25 frutos, 20 semillas (sin pericarpo; esta estructura solo se evaluó en el experimento II) y 20 embriones (sin pericarpo ni cubierta seminal) en placas de Petri de 9 cm de diámetro (n=3) sobre dos capas de papel de filtro humedecidas con 5 ml de agua destilada y se incubaron durante 15 días a diferentes temperaturas (*año 1*-10, 15, 20, 25 y 30°C, *años 2 y 3*- 10 y 25°C). Las placas de Petri se sellaron con un film plástico para evitar la evaporación del agua durante la incubación y se añadió agua siempre que fue necesario. Cuando se evaluó la germinación de las semillas, el pericarpo fue extraído manualmente. Cuando los embriones fueron el objeto de estudio, la cubierta seminal se retiró después de la hidratación de la semilla desnuda (sin pericarpo) durante 30 minutos en agua destilada, para facilitar la separación del embrión sin dañarlo (Bodrone et al., 2017). La emergencia de la radícula fuera del pericarpo y la elongación de la radícula en 3 mm fueron los criterios para definir la ocurrencia de la germinación en las tres estructuras analizadas (fruto, semilla y embrión). El recuento de germinación fue cada dos días, y cada unidad germinada se retiró de la placa de Petri luego del recuento.

#### 2.2.4. Análisis estadístico.

Las variables ambientales y los datos relacionados al rendimiento del experimento II se analizaron mediante un análisis de la varianza y un test de comparaciones de medias (Tukey), con un nivel de significancia del 5%. La evolución del peso seco del fruto se ajustó a un modelo de regresión bilineal con un punto de corte, que corresponde al momento MF. El modelo se corresponde con la siguiente ecuación:  $Y = a + b \cdot x \ (x < c) + b \cdot c \ (x \geq c)$  donde “Y” es el peso seco del fruto, “a” es la ordenada al origen, “b” es la tasa de llenado efectivo (mg/d), y “c” es el momento de finalización del llenado, o sea, la MF (Ploschuk y Hall, 1995). Por otro lado, se ajustó una ecuación lineal para modelar la

pérdida de humedad del fruto en FS tempranas y un modelo bilineal en función de los días desde R5.5 para las FS tardías. En este último caso, se determinó una tasa inicial y final de secado (en % d<sup>-1</sup>) y el punto de quiebre en el que ocurre el cambio entre dichas tasas (en días desde R5.5) (Chazarreta et al., 2018). Se presentan los valores medios y los EE de la germinación final (luego de los 15 días de incubación). En ambos experimentos, se analizaron mediante regresiones lineales ( $\alpha=0.05$ , se presentan los coeficientes de Pearson “r”) la relación existente entre (i) la duración de la etapa Siembra–Antesis y la temperatura media diaria experimentada por las plantas durante este período y (ii) la germinación de los frutos durante el almacenaje post-cosecha y las variables ambientales registradas durante el desarrollo del fruto en la planta madre.

Se realizaron análisis de componentes principales y de conglomerados para describir los cambios en los atributos de dormición según la FS y de los genotipos estudiados a lo largo de los tres años de evaluación experimental. El análisis de los componentes principales (ACP) se realizó utilizando las siguientes variables asociadas a los atributos de dormición: porcentaje final de germinación a cosecha para frutos incubados a 10°C (G.F.10) y 25°C (G.F.25), porcentaje final de germinación a cosecha para embriones incubados a 10°C (G.E.10) y 25°C (G.E.25), y tiempo de almacenaje post-cosecha (en días) necesario para alcanzar el 50% de germinación para frutos incubados a 10°C (T<sub>50</sub>.F.10) y 25°C (T<sub>50</sub>.F.25). T<sub>50</sub>.F.10 y T<sub>50</sub>.F.25 fueron estimados por interpolación lineal, entre puntos cercanos al 50% de germinación. Para los casos en que el porcentaje de germinación superó el 50% a cosecha, T<sub>50</sub>.F se consideró como "0 días". Por el contrario, cuando la germinación no alcanzó el 50% durante el período de almacenaje post-cosecha evaluado (150 días para el año 1, 90 días para los años 2 y 3) T<sub>50</sub>.F se consideró como el tiempo máximo de almacenaje (es decir, 150 o 90 días). Como las seis variables se expresaron en diferentes escalas, las observaciones se estandarizaron



para el análisis. El resultado de este análisis fue un biplot bidimensional (Gabriel, 1971). El análisis de conglomerados (AC) fue realizado considerando las diferencias entre FS para las seis variables utilizadas en el ACP (es decir, “G.F.25 FS tardía” – “G.F.25 FS temprana”). La suma de los cuadrados incrementales fue el criterio de fusión de grupos utilizado y la distancia euclídea al cuadrado la medida de diferencia para el método de Ward (Ward, 1963). Se realizó un análisis de correlación de Pearson ( $\alpha=0.05$ ) entre las coordenadas o “scores” de los componentes principales 1 y 2 (CP1 y CP2) y las variables ambientales registradas durante el desarrollo del fruto (de la Vega et al., 2001),

Infostat (Di Rienzo et al., 2012), GraphPad Prism 7 (Motulsky, 2003) y RStudio (R Core Team, 2013; paquetes “stats”, “factoextra” por Kassambara y Mundt, 2017, “cluster” por Maechler et al., 2018, “Factoshiny” por Vaissie et al., 2018 y “PerformanceAnalytics” por Peterson y Carl, 2019) fueron los programas estadísticos utilizados para realizar los análisis.

## **2.3. Resultados**

### 2.3.1. Caracterización del ambiente explorado por las plantas durante el desarrollo de los frutos. Experimento I.

Los cambios en la FS determinaron la exposición de las plantas a diferentes condiciones térmicas, fotoperiódicas y de radiación solar durante todo el ciclo del cultivo (Cuadro 2.2; Cuadro S2.1). Como era de esperarse, durante la etapa Antesis–MC, las FS tardías experimentaron una disminución de 4.3°C, 4.7°C y 3.7°C en las temperaturas media, máxima y mínima, respectivamente, y de 2.2 h y 7.7MJ m<sup>-2</sup> en el fotoperíodo medio y la radiación incidente media, respectivamente (Cuadro 2.2). Sin embargo, en la etapa Siembra–Antesis, se observó lo contrario: plantas de FS tempranas experimentaron valores promedios más bajos de las variables ambientales registradas que plantas de FS

**Cuadro 2.2.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas en el período Antesis–MC según FS (Temprana o Tardía), genotipo y año evaluado, y la duración, en días, de la etapa Antesis–MC, para el Experimento I. **Los valores resaltados en negrita representan las medias ( $\pm$ DE) de las variables ambientales para todos los genotipos en cada FS.** Letras distintas indican diferencias significativas entre FS ( $p$ -valor $<0.05$ ). Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en  $^{\circ}$ C; Fp (h): Fotoperíodo medio, en horas; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en  $\text{MJ m}^{-2}$ ; Duración etapa Antesis–MC, en días.

<b>Año–FS– Genotipo</b>	<b>TMd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>TMMxd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>TMMnd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Fp (h)</b>	<b>RIMd (<math>\text{MJ m}^{-2}</math>)</b>	<b>Duración etapa Antesis–MC (d)</b>
1–Temprana–AAL	25.3 ( $\pm$ 2.1)	30.7 ( $\pm$ 2.5)	20.5 ( $\pm$ 2.4)	14.9 ( $\pm$ 0.3)	23.7 ( $\pm$ 5.8)	42.1 ( $\pm$ 7.8)
1–Tardía–AAL	20.8 ( $\pm$ 2.9)	25.4 ( $\pm$ 3.8)	16.5 ( $\pm$ 2.9)	13.1 ( $\pm$ 0.6)	15.6 ( $\pm$ 6.8)	56.2 ( $\pm$ 2.5)
1–Temprana–BAR	25.3 ( $\pm$ 2.0)	30.5 ( $\pm$ 2.4)	20.8 ( $\pm$ 2.4)	15.0 ( $\pm$ 0.3)	23.1 ( $\pm$ 6.0)	49.8 ( $\pm$ 9.9)
1–Tardía–BAR	19.6 ( $\pm$ 2.5)	24.0 ( $\pm$ 3.4)	15.6 ( $\pm$ 2.8)	12.8 ( $\pm$ 0.6)	13.2 ( $\pm$ 6.6)	64.5 ( $\pm$ 1.5)
1–Temprana–LMA	25.7 ( $\pm$ 2.0)	31.9 ( $\pm$ 2.4)	20.9 ( $\pm$ 2.3)	14.8 ( $\pm$ 0.3)	23.5 ( $\pm$ 5.8)	37.3 ( $\pm$ 7.2)
1–Tardía–LMA	20.9 ( $\pm$ 2.7)	25.6 ( $\pm$ 3.6)	16.6 ( $\pm$ 2.9)	13.2 ( $\pm$ 0.5)	15.6 ( $\pm$ 6.7)	54.5 ( $\pm$ 1.7)
1–Temprana–1552	25.1 ( $\pm$ 2.2)	30.3 ( $\pm$ 2.5)	20.3 ( $\pm$ 2.5)	15.1 ( $\pm$ 0.4)	23.9 ( $\pm$ 6.2)	75.2 ( $\pm$ 4.0)
1–Tardía–1552	23.3 ( $\pm$ 3.2)	28.3 ( $\pm$ 3.8)	18.7 ( $\pm$ 3.4)	14.1 ( $\pm$ 0.9)	19.6 ( $\pm$ 7.1)	66.5 ( $\pm$ 3.0)
1–Temprana–1579	25.6 ( $\pm$ 2.0)	30.7 ( $\pm$ 2.3)	20.9 ( $\pm$ 2.3)	15.0 ( $\pm$ 0.4)	23.4 ( $\pm$ 6.1)	57.6 ( $\pm$ 1.8)
1–Tardía–1579	22.6 ( $\pm$ 3.6)	27.8 ( $\pm$ 4.0)	17.7 ( $\pm$ 3.7)	13.6 ( $\pm$ 0.6)	18.6 ( $\pm$ 6.1)	55.0 ( $\pm$ 1.5)
1–Temprana–609	25.2 ( $\pm$ 2.1)	30.3 ( $\pm$ 2.5)	20.5 ( $\pm$ 2.4)	15.0 ( $\pm$ 0.4)	23.6 ( $\pm$ 6.3)	69.9 ( $\pm$ 2.2)
1–Tardía–609	21.6 ( $\pm$ 3.5)	26.4 ( $\pm$ 4.3)	17.6 ( $\pm$ 3.3)	13.3 ( $\pm$ 0.6)	16.6 ( $\pm$ 7.2)	62.4 ( $\pm$ 1.8)
1–Temprana–EC	24.8 ( $\pm$ 2.6)	29.9 ( $\pm$ 3.0)	20.1 ( $\pm$ 3.0)	14.6 ( $\pm$ 0.6)	21.0 ( $\pm$ 6.2)	70.4 ( $\pm$ 4.3)
1–Tardía–EC	21.6 ( $\pm$ 3.5)	26.3 ( $\pm$ 4.3)	17.2 ( $\pm$ 3.3)	13.3 ( $\pm$ 0.7)	16.3 ( $\pm$ 7.2)	65.4 ( $\pm$ 2.8)
1–Temprana–HA89	25.0 ( $\pm$ 2.3)	30.1 ( $\pm$ 2.8)	20.4 ( $\pm$ 2.6)	14.7 ( $\pm$ 0.6)	22.2 ( $\pm$ 6.6)	75.1 ( $\pm$ 2.7)
1–Tardía–HA89	22.5 ( $\pm$ 3.5)	27.4 ( $\pm$ 4.1)	17.9 ( $\pm$ 3.5)	13.5 ( $\pm$ 0.6)	17.8 ( $\pm$ 7.0)	63.3 ( $\pm$ 0.5)
<b>1–Temprana</b>	<b>25.6 (<math>\pm</math>0.2)<sup>a</sup></b>	<b>30.5 (<math>\pm</math>0.4)<sup>a</sup></b>	<b>20.5 (<math>\pm</math>0.3)<sup>a</sup></b>	<b>14.9 (<math>\pm</math>0.1)<sup>a</sup></b>	<b>23.1 (<math>\pm</math>0.9)<sup>a</sup></b>	<b>59.7 (<math>\pm</math>15.1)<sup>a</sup></b>
<b>1–Tardía</b>	<b>21.6 (<math>\pm</math>1.1)<sup>b</sup></b>	<b>26.4 (<math>\pm</math>1.4)<sup>b</sup></b>	<b>17.2 (<math>\pm</math>0.9)<sup>b</sup></b>	<b>13.6 (<math>\pm</math>0.3)<sup>b</sup></b>	<b>16.6 (<math>\pm</math>2.0)<sup>b</sup></b>	<b>61.0 (<math>\pm</math>4.9)<sup>a</sup></b>
2–Temprana–581	24.8 ( $\pm$ 2.7)	30.0 ( $\pm$ 2.9)	19.6 ( $\pm$ 3.5)	15.3 ( $\pm$ 0.1)	22.6 ( $\pm$ 7.5)	48.3 ( $\pm$ 4.7)
2–Tardía–581	20.0 ( $\pm$ 2.7)	25.0 ( $\pm$ 2.7)	15.5 ( $\pm$ 3.8)	12.7 ( $\pm$ 0.4)	14.4 ( $\pm$ 5.3)	48.0 ( $\pm$ 2.9)
2–Temprana–591	24.7 ( $\pm$ 2.5)	30.2 ( $\pm$ 2.8)	19.3 ( $\pm$ 3.4)	15.3 ( $\pm$ 0.1)	22.9 ( $\pm$ 7.7)	47.3 ( $\pm$ 0.5)
2–Tardía–591	20.2 ( $\pm$ 2.7)	25.1 ( $\pm$ 2.7)	15.6 ( $\pm$ 3.8)	12.7 ( $\pm$ 0.4)	14.7 ( $\pm$ 5.4)	49.7 ( $\pm$ 1.5)
2–Temprana–600	24.7 ( $\pm$ 2.5)	30.1 ( $\pm$ 2.8)	19.4 ( $\pm$ 3.4)	15.3 ( $\pm$ 0.1)	22.9 ( $\pm$ 7.8)	47.1 ( $\pm$ 5.9)
2–Tardía–600	20.0 ( $\pm$ 2.7)	24.9 ( $\pm$ 2.7)	15.5 ( $\pm$ 3.8)	12.7 ( $\pm$ 0.4)	14.4 ( $\pm$ 5.3)	40.7 ( $\pm$ 1.2)
2–Temprana–601	24.6 ( $\pm$ 2.5)	30.3 ( $\pm$ 2.0)	19.0 ( $\pm$ 3.3)	15.4 ( $\pm$ 0.0)	23.4 ( $\pm$ 7.4)	42.1 ( $\pm$ 6.0)

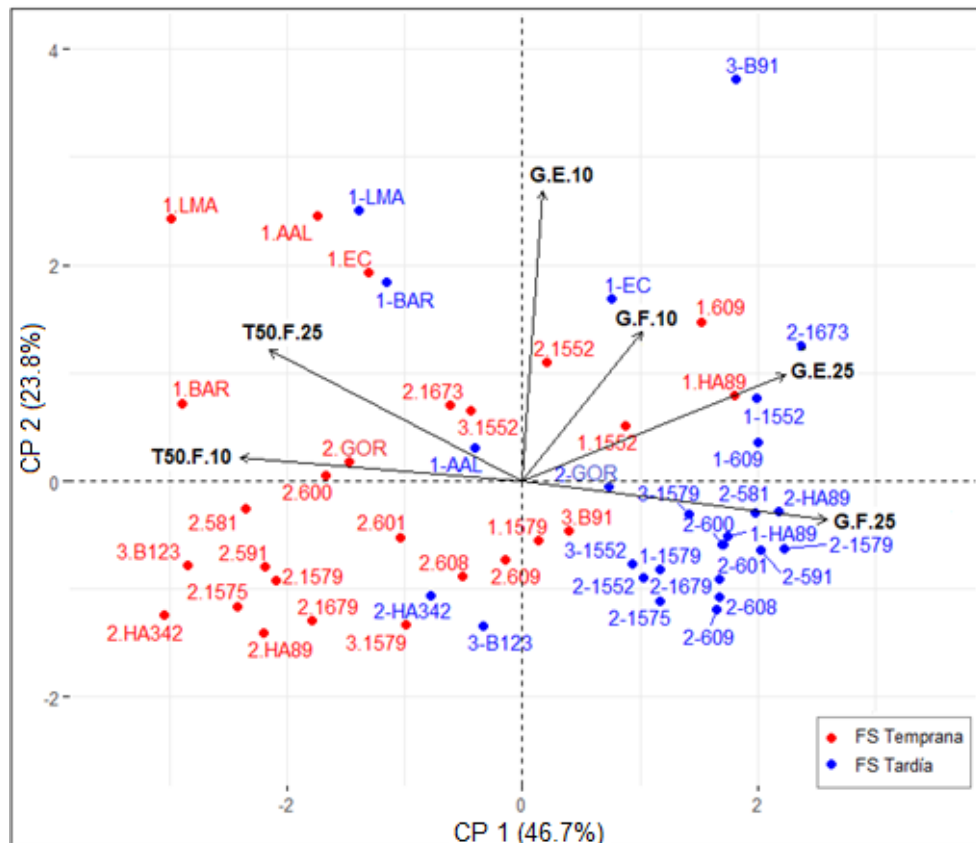
2–Tardía–601	19.8 (±2.7)	24.7 (±2.6)	15.2 (±3.8)	12.6 (±0.4)	14.6 (±5.4)	45.5 (±0.6)
2–Temprana–608	24.5 (±2.5)	30.2 (±2.7)	19.0 (±3.4)	15.4 (±0.0)	23.3 (±7.5)	50.0 (±1.7)
2–Tardía–608	19.8 (±2.7)	24.7 (±2.6)	15.2 (±3.8)	12.6 (±0.4)	14.6 (±5.4)	46.3 (±1.3)
2–Temprana–609	24.5 (±2.4)	30.2 (±2.6)	19.0 (±3.3)	15.4 (±0.0)	23.7 (±7.3)	41.5 (±5.7)
2–Tardía–609	19.9 (±2.7)	24.8 (±2.7)	15.3 (±3.8)	12.7 (±0.4)	14.5 (±5.4)	47.8 (±1.0)
2–Temprana–1552	23.9 (±2.9)	29.6 (±3.1)	18.4 (±3.8)	15.3 (±0.1)	23.6 (±7.2)	45.1 (±2.9)
2–Tardía–1552	20.1 (±2.7)	25.1 (±2.7)	15.5 (±3.8)	12.7 (±0.4)	14.8 (±5.3)	45.3 (±1.8)
2–Temprana–1575	25.1 (±2.5)	30.3 (±2.7)	20.1 (±3.2)	15.3 (±0.1)	22.3 (±7.7)	51.1 (±4.0)
2–Tardía–1575	19.6 (±2.8)	24.6 (±2.9)	15.1 (±3.9)	12.6 (±0.4)	14.0 (±5.3)	48.9 (±1.9)
2–Temprana–1579	24.8 (±2.8)	30.0 (±2.9)	19.5 (±3.5)	15.3 (±0.2)	22.6 (±7.5)	49.8 (±4.2)
2–Tardía–1579	20.4 (±2.4)	25.4 (±2.4)	15.6 (±3.8)	12.8 (±0.3)	14.9 (±5.6)	45.3 (±1.4)
2–Temprana–1673	25.0 (±2.5)	30.3 (±2.7)	19.9 (±3.2)	15.3 (±0.1)	22.2 (±8.0)	42.3 (±5.5)
2–Tardía–1673	20.1 (±2.7)	25.1 (±2.7)	15.5 (±3.8)	12.7 (±0.4)	14.8 (±5.3)	43.8 (±1.6)
2–Temprana–1679	24.8 (±2.6)	30.1 (±2.8)	19.6 (±3.3)	15.3 (±0.1)	22.7 (±7.8)	48.6 (±1.8)
2–Tardía–1679	19.9 (±2.7)	24.8 (±2.7)	15.3 (±3.8)	12.7 (±0.4)	14.5 (±5.4)	48.2 (±1.7)
2–Temprana–GB	24.5 (±2.7)	29.5 (±3.1)	19.8 (±3.2)	15.0 (±0.4)	20.8 (±7.6)	57.2 (±4.1)
2–Tardía–GB	19.3 (±3.0)	24.4 (±3.0)	14.7 (±3.9)	12.5 (±0.5)	13.9 (±5.3)	56.1 (±1.3)
2–Temprana–HA342	24.7 (±2.5)	30.1 (±2.8)	19.4 (±3.4)	15.3 (±0.1)	22.9 (±7.8)	43.5 (±2.3)
2–Tardía–HA342	20.2 (±2.7)	25.1 (±2.7)	15.6 (±3.8)	12.8 (±0.4)	14.7 (±5.4)	44.3 (±1.3)
2–Temprana–HA89	24.8 (±2.8)	30.0 (±2.9)	19.7 (±3.5)	15.3 (±0.2)	22.4 (±7.6)	45.3 (±3.0)
2–Tardía–HA89	19.6 (±2.8)	24.6 (±2.9)	15.1 (±3.9)	12.6 (±0.4)	14.0 (±5.3)	46.5 (±1.4)
<b>2–Temprana</b>	<b>24.7 (±0.2)<sup>a</sup></b>	<b>30.1 (±0.2)<sup>a</sup></b>	<b>19.4 (±0.4)<sup>a</sup></b>	<b>15.3 (±0.2)<sup>a</sup></b>	<b>22.7 (±0.7)<sup>a</sup></b>	<b>46.6 (±4.2)<sup>a</sup></b>
<b>2–Tardía</b>	<b>19.9 (±0.2)<sup>b</sup></b>	<b>24.9 (±0.2)<sup>b</sup></b>	<b>15.3 (±0.2)<sup>b</sup></b>	<b>12.7 (±0.1)<sup>b</sup></b>	<b>14.5 (±0.3)<sup>b</sup></b>	<b>43.0 (±5.4)<sup>a</sup></b>
3–Temprana–1552	25.2 (±3.1)	30.9 (±3.6)	19.7 (±3.3)	14.9 (±0.4)	25.9 (±6.4)	49.8 (±2.1)
3–Tardía–1552	21.5 (±3.2)	26.8 (±3.8)	16.7 (±3.6)	12.8 (±0.5)	17.7 (±6.2)	48.3 (±1.5)
3–Temprana–1579	25.2 (±3.1)	31.0 (±3.6)	19.8 (±3.2)	14.9 (±0.4)	25.7 (±6.5)	48.5 (±1.7)
3–Tardía–1579	21.5 (±3.1)	26.8 (±3.7)	16.7 (±3.6)	12.8 (±0.5)	17.9 (±6.2)	53.0 (±1.5)
3–Temprana–B123	25.1 (±3.2)	30.7 (±4.0)	19.8 (±3.1)	15.1 (±0.3)	25.6 (±7.4)	54.2 (±1.1)
3–Tardía–B123	21.3 (±3.2)	26.7 (±3.9)	16.4 (±3.6)	12.9 (±0.5)	18.3 (±5.9)	51.9 (±2.0)
3–Temprana–B91	25.1 (±3.0)	30.8 (±3.5)	19.8 (±3.2)	14.8 (±0.4)	25.6 (±6.3)	57.8 (±1.2)
3–Tardía–B91	21.3 (±3.1)	26.4 (±3.7)	16.7 (±3.6)	12.7 (±0.5)	16.7 (±6.6)	52.0 (±1.7)
<b>3–Temprana</b>	<b>25.2 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>30.8 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>19.8 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>14.9 (±0.2)<sup>a</sup></b>	<b>25.7 (±0.2)<sup>a</sup></b>	<b>52.7 (±4.3)<sup>a</sup></b>
<b>3–Tardía</b>	<b>21.4 (±0.2)<sup>b</sup></b>	<b>26.7 (±0.2)<sup>b</sup></b>	<b>16.6 (±0.1)<sup>b</sup></b>	<b>12.8 (±0.1)<sup>b</sup></b>	<b>17.6 (±0.7)<sup>b</sup></b>	<b>51.3 (±2.1)<sup>a</sup></b>

tardías (Cuadro S2.1). En particular, las temperaturas medias más bajas exploradas durante este período explicaron, en parte, la mayor duración de la fase vegetativa en las FS tempranas (primavera) en relación a las registradas en las FS tardías (verano) (Cuadro S2.1).

En los años experimentales 1 y 3 (15/16 y 17/18, respectivamente), ambas FS presentaron temperaturas medias, máximas y mínimas más altas durante la etapa de Antesis–MC que el año experimental 2 (16/17). Por otra parte, el año 3 presentó la mayor radiación incidente promedio en ambas FS. En cuanto a la duración del período Antesis–MC, hubo una diferencia de 10 días, en promedio en ambas FS, entre el año 1 y los años 2 y 3. La duración de esta etapa fue mayor en el año 1 debido a un atraso en el momento de cosecha en ambas FS.

### 2.3.2. Análisis de los componentes principales.

Los CP1 y CP2 explicaron alrededor del 70% de la variabilidad de los datos originales (46.7% y 23.8%, respectivamente) (Fig. 2.1). Los atributos que contribuyeron a la variabilidad explicada por el CP1 fueron G.F.25, G.E.25, T<sub>50</sub>.F.10 y T<sub>50</sub>.F.25, mientras que G.F.10 y G.E.10 contribuyeron a la variabilidad explicada por el CP2, aunque G.E.10 fue más relevante debido a que presentó un mayor largo del vector. Para todos los genotipos en los tres años experimentales, los frutos y embriones incubados a 25°C (G.F.25 y G.E.25, respectivamente) de plantas sembradas en FS tardías mostraron un mayor nivel de germinación a cosecha que las mismas estructuras provenientes de FS tempranas. Asimismo, los días de almacenaje post-cosecha requeridos para alcanzar el 50% de germinación de los frutos fueron menores en FS tardías, independientemente de la temperatura de incubación (T<sub>50</sub>.F.10 y T<sub>50</sub>.F.25). El CP2 discriminó según la germinación a cosecha a baja temperaturas de incubación (10°C). El efecto del atraso en la FS sólo tuvo un efecto de promoción de la germinación en frutos y embriones a cosecha



**Fig. 2. 1.** Biplot del primer y segundo componente principal basado en variables estandarizadas relacionadas con la dormición (G.F.10, G.E.10, G.F.25, G.E.25, T<sub>50</sub>.F.10 y T<sub>50</sub>.F.25), para el Experimento I. Las variables están representadas por vectores desde el origen, mientras que los genotipos por puntos. Los puntos rojos simbolizan los genotipos provenientes de FS tempranas, y los azules, de FS tardías. El número que precede al nombre del genotipo representa el año experimental en que se evaluó.

en el genotipo B91. Por el contrario, las FS tempranas mejoraron la germinación a 10°C de los embriones a cosecha en algunos genotipos (AAL, 609, HA89 evaluados en el año 1 y 1552 en los años 2 y 3). Los frutos y embriones de FS tempranas presentaron una mayor variabilidad en su respuesta germinativa en ambos componentes principales que los de FS tardías. Los genotipos provenientes del año experimental 1 (Fig. 2.1, puntos que comienzan con un número "1" antes del nombre del genotipo) mostraron, en general, un menor nivel de dormición que los años 2 y 3, incluso en FS tempranas. Este comportamiento puede explicarse, en parte, por el atraso en la cosecha del primer año experimental en comparación con los años siguientes (Cuadro 2.2). Las poblaciones naturalizadas BAR, LMA y AAL, se localizaron a la izquierda en lo que respecta al CP1 (es decir, mayor nivel de dormición), incluso en FS tardías. Estos genotipos presentaron

valores relativos bajos de G.F.25 y G.F.25 y valores relativos altos de T50.F.10 y T50.F.25 en ambas FS. Más allá de que se observaron diferencias entre FS, los genotipos HA342 y B123 también mostraron un porcentaje relativamente bajo de germinación de frutos y embriones a cosecha en ambas temperaturas de incubación incluso en FS tardías. Por otra parte, los genotipos evaluados en el año 2, como el 581, 591, 1579 y HA89, son ejemplos en los que las FS tardías promovieron marcadamente la germinación a cosecha (y redujeron los tiempos en alcanzar el 50% de la germinación a ambas temperaturas de incubación) a lo largo del CP1.

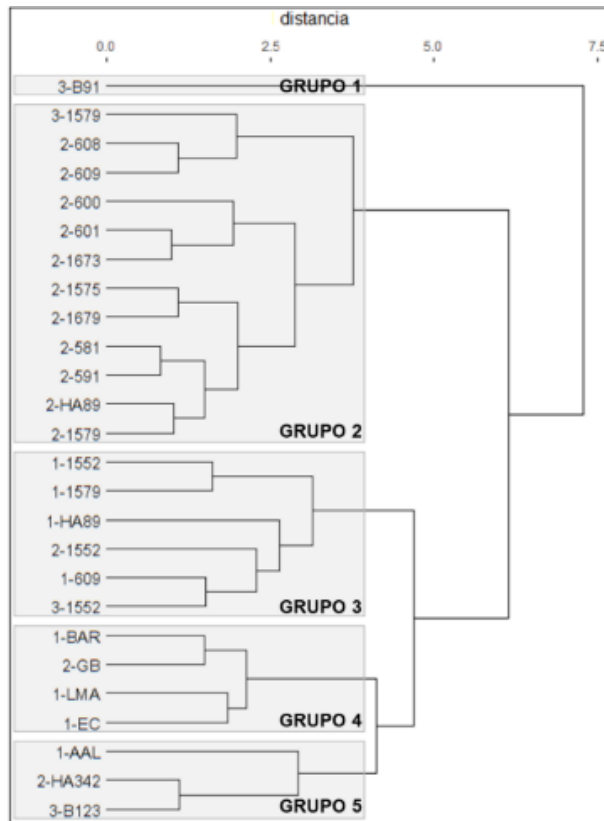
Las coordenadas del CP1 mostraron una asociación negativa y significativa con todas las variables ambientales registradas en la etapa Antesis–MC (Cuadro 2.3). Esto indica que los genotipos que presentaron un alto porcentaje de germinación de frutos y embriones a cosecha a altas temperaturas de incubación y, en consecuencia, los que requirieron menos días para lograr el 50% de germinación de frutos a 10 y 25°C, se asociaron con disminuciones de las temperaturas media, máxima y mínima, el fotoperíodo y la radiación incidente. Todas estas condiciones son las que experimentan los cultivos sembrados en FS tardías. Por otra parte, las coordenadas del CP2 (es decir, la germinación a 10°C) no se asociaron con ninguna variable ambiental registrada.

**Cuadro 2. 3.** Coeficientes de correlación “r” de Pearson entre los CP1 y CP2 y las variables ambientales registradas en la etapa Antesis–MC (Cuadro 2.2), para el Experimento I. Los asteriscos indican una relación significativa (p-valor<0.05).

<b>Variable Ambiental</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>
Temperatura Media diaria (°C)	-0.61*	0.10
Temperatura Media Máxima diaria (°C)	-0.60*	0.07
Temperatura Media Mínima diaria (°C)	-0.58*	0.14
Fotoperíodo medio (h)	-0.69*	0.10
Radiación Incidente Media diaria (MJ m <sup>-2</sup> )	-0.62*	0.12

### 2.3.3. Análisis de conglomerados

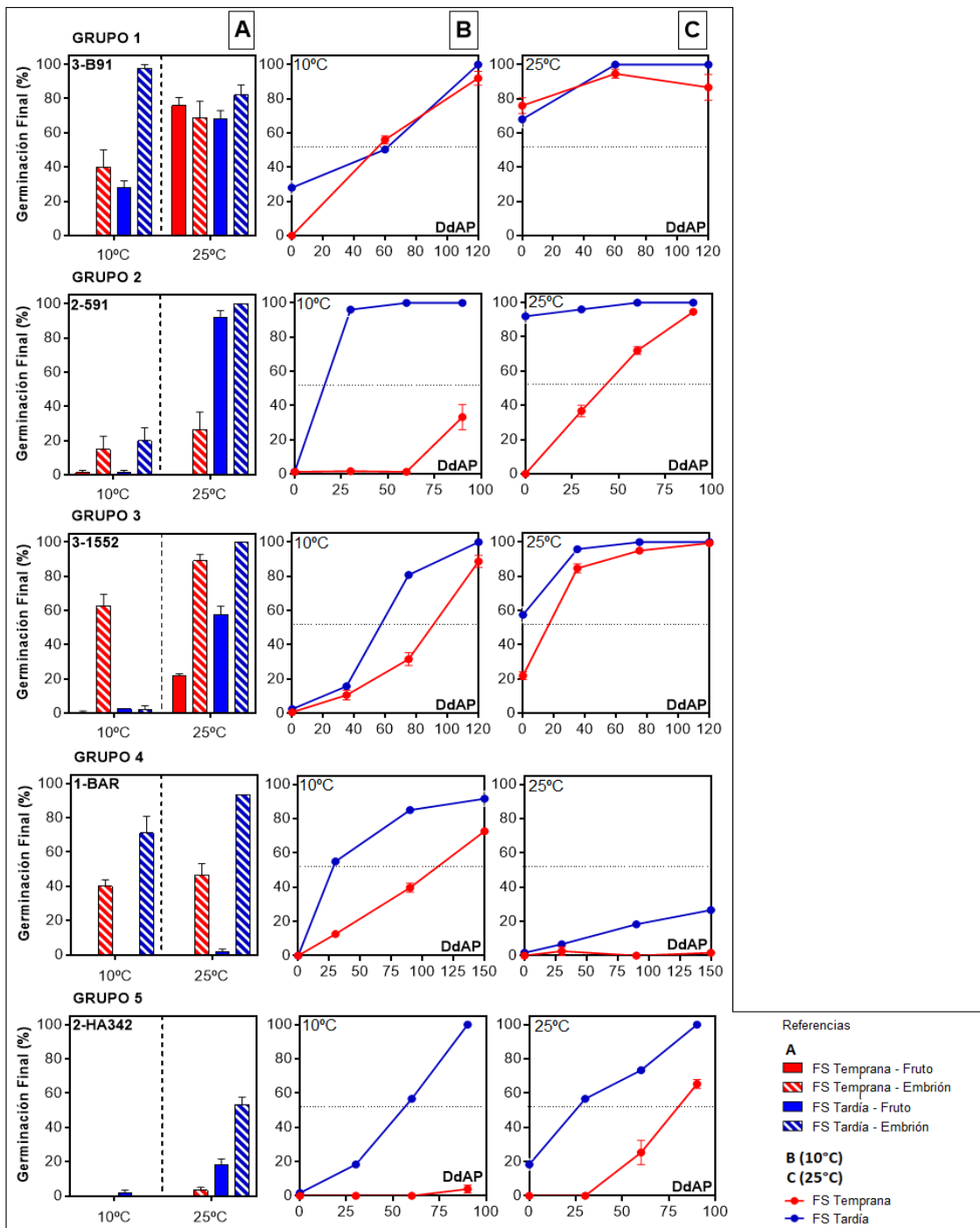
Los genotipos evaluados a lo largo de los tres años experimentales se clasificaron en cinco grupos en función de las diferencias en sus respuestas de germinación entre FS



**Fig. 2. 2.** Dendrograma de los 20 genotipos agrupados según las diferencias entre FS tardías y tempranas de las variables de germinación analizadas (G.F.10, G.E.10, G.F.25, G.E.25, T<sub>50</sub>.F.10 y T<sub>50</sub>.F.25), para el Experimento I.

(Fig. 2.2). En la Fig. 2.3 se presenta un ejemplo representativo de cada grupo, en el que se muestran los atributos de dormición relacionados con las variables de germinación registradas (el comportamiento de todos los genotipos en cada grupo se presenta en la Fig. S2.1).

El *grupo 1* incluye únicamente al genotipo 3–B91. En este genotipo las FS tardías promovieron la germinación de los frutos y embriones a cosecha a bajas temperaturas de incubación (10°C), donde frecuentemente se expresa la dormición embrionaria en frutos de girasol. Por otra parte, la salida de la dormición de los frutos durante el almacenaje post-cosecha (T<sub>50</sub>.F.10 y T<sub>50</sub>.F.25) no mostró diferencias entre FS bajo ninguna temperatura de incubación.



**Fig. 2. 3.** Ejemplos del comportamiento germinativo de genotipos según los grupos determinados por el AC (Fig. 2.2). A. Porcentaje final de germinación de frutos (barras llenas) y embriones (barras con líneas diagonales) a cosecha, incubados a 10 y 25°C, provenientes de FS tempranas (barras rojas) y tardías (barras azules). Porcentaje final de germinación de frutos en función de los días de almacenaje post-cosecha (DdAP), provenientes de FS tempranas (líneas rojas) y tardías (líneas azules), incubados a 10°C (B) y a 25°C (C). Las barras (A) y los puntos (B y C) representan los valores medios de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. En la Fig. S2.1 se presentan todos los genotipos de cada grupo.

El *grupo 2* está formado por los genotipos 2-581, 2-591, 2-600, 2-601, 2-608, 2-609, 2-1575, 2-1579, 2-1673, 2-1679, 2-HA89, 3-1579. En este grupo, las FS



determinaron diferencias marcadas en el nivel de dormición: tanto los frutos como los embriones de FS tardías incubados a 25°C mostraron un porcentaje de germinación máximo o cercano al máximo (100%) a cosecha, mientras que frutos y embriones provenientes de FS tempranas evaluados a la misma temperatura de incubación presentaron un porcentaje de germinación nulo o cercano al 20%, respectivamente. Asimismo, los frutos de FS tempranas mostraron una dinámica de salida de la dormición lenta durante el almacenaje post-cosecha. A 10°C de incubación, los frutos y los embriones de ambas FS mostraron un alto nivel de dormición a cosecha. Sin embargo, la velocidad de salida de la dormición de frutos incubados bajo esta temperatura fue significativamente mayor para aquellos provenientes de FS tardías.

El *grupo 3* agrupa a los genotipos 1-609, 1-1552, 1-1579, 1-HA89, 2-1552, 3-1552. En este grupo, el porcentaje de germinación de embriones a cosecha, provenientes de ambas FS fue máximo cuando se incubaron a 25°C. Sin embargo, los frutos cosechados de plantas sembradas tardíamente germinaron más a esta temperatura que los provenientes de plantas sembradas en primavera. Por otro lado, a 10°C de incubación, la germinación de los embriones fue mayor en las FS tempranas, mientras que los frutos presentaron un porcentaje de germinación prácticamente nulo (es decir, alto nivel de dormición) en ambas FS. Durante el almacenaje post-cosecha, los frutos de FS tardías alcanzaron el 50% de la germinación a 10°C más rápido que los de las FS tempranas en la mayoría de los genotipos, mientras que a 25°C los frutos de ambas FS mostraron una rápida y similar dinámica de salida de la dormición. Este grupo mostró una menor respuesta al atraso en la FS en comparación con el grupo 2. Como se ha comentado anteriormente, esto puede deberse en parte a la demora en la cosecha durante el primer año experimental (Cuadro 2.2), ya que los genotipos que se reevaluaron al año siguiente (Año 2, 2016/2017), 2-1579, 2-609 y 2-HA89, formaron parte del grupo 2. El genotipo

1552 se agrupó en el mismo grupo en los tres años experimentales, lo que indica una gran estabilidad en la respuesta al atrasar la FS en este genotipo.

El *grupo 4* incluye a los genotipos 1–LMA, 1–BAR, 1–EC, 2–GB. Se observó un alto nivel de dormición de frutos a cosecha bajo ambas temperaturas de incubación para la mayoría de los genotipos en ambas FS. Lo contrario ocurrió con los embriones: estos presentaron un nivel de dormición variable, con diferencias entre FS dependientes del genotipo. Durante el almacenaje post-cosecha, se observaron grandes diferencias entre FS cuando los frutos se incubaron a 10°C (las FS tardías mostraron un menor tiempo en alcanzar el 50% de la germinación que las FS tempranas), mientras que las diferencias fueron menos evidentes cuando la germinación ocurrió a 25°C. En el caso de LMA y BAR (genotipos silvestres; Fig. S2.1), los valores de germinación fueron inferiores a 25°C en comparación con 10°C, y se mantuvieron por debajo del 30% en ambas FS incluso después de 150 días de almacenaje, evidenciando la presencia de termo–inhibición (Gay et al., 1991; Sung et al., 1998; Argyris et al., 2008; Contreras et al., 2009; Domínguez et al., 2016, 2019; Arata et al., 2021).

Finalmente, el *grupo 5* está formado por 1–AAL, 3–B123 y 2–HA342. Este grupo también se caracterizó por un profundo nivel de dormición de frutos a cosecha, en ambas FS y temperaturas de incubación. Los materiales cultivados (HA342 y B123; Fig. S2.1) mostraron una baja germinación embrionaria a cosecha, aunque las FS tardías mejoraron ligeramente la germinación tanto de frutos como de embriones cuando fueron incubados a 25°C. Por otro lado, el genotipo silvestre (AAL; Fig. S2.1) mostró una mayor germinación de embriones a bajas temperaturas de incubación en la FS temprana. Durante el almacenaje, los frutos de las FS tardías mostraron una salida de dormición más rápida que los de las FS tempranas, a ambas temperaturas de incubación. La termo–inhibición también se observó en la población silvestre cuando se incubó a 25°C, tal como se reportó

en los genotipos silvestres del grupo 4. Sin embargo, en este caso fue más débil y se alivió significativamente con las FS tardías. Cabe aclarar que, aunque los grupos 4 y 5 son muy similares entre sí, en el grupo 5, las diferencias entre FS en T<sub>50</sub>.F.25 fueron mayores que en T<sub>50</sub>.F.10 (excepto HA342), comparado con lo observado en el grupo 4. Esta fue la principal razón de la separación entre estos grupos.

#### 2.3.4. Caracterización del ambiente explorado por las plantas durante el desarrollo del fruto. Experimento II.

De manera similar al experimento I, el atraso en la FS determinó una disminución de las temperaturas medias, máximas y mínimas diarias, del fotoperíodo promedio diario y de la radiación incidente media diaria, experimentada por las plantas durante la etapa Antesis–MC (Cuadro 2.4). Sin embargo, el ambiente térmico, fotoperiódico y de radiación incidente explorado por las plantas sembradas el 1 de septiembre, el 3 de octubre y el 1 de noviembre fue relativamente similar (letras iguales), mientras que las sembradas el 1 de diciembre y el 4 de enero mostraron valores inferiores para cada una de las variables ambientales registradas durante el período (Cuadro 2.4).

**Cuadro 2.4.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas entre Antesis-MC (R5.5, Schneiter y Miller, 1981), para el genotipo 1579 según FS, en la campaña 16/17 (experimento II). Letras distintas indican diferencias significativas entre FS ( $p$ -valor $<0.05$ ). Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en  $^{\circ}$ C; Fp (h): Fotoperíodo medio, en horas; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en  $\text{MJ m}^{-2}$ .

FS	TMd ( $^{\circ}$ C)	TMMxd ( $^{\circ}$ C)	TMMnd ( $^{\circ}$ C)	Fp (h)	RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ )
1 de septiembre	24.8 ( $\pm 2.8$ ) <sup>ab</sup>	30.0 ( $\pm 2.9$ ) <sup>a</sup>	19.5 ( $\pm 3.5$ ) <sup>a</sup>	15.3 ( $\pm 0.2$ ) <sup>a</sup>	22.6 ( $\pm 7.5$ ) <sup>a</sup>
3 de octubre	24.7 ( $\pm 2.9$ ) <sup>ab</sup>	29.7 ( $\pm 3.2$ ) <sup>a</sup>	19.8 ( $\pm 3.6$ ) <sup>a</sup>	15.1 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	21.4 ( $\pm 7.1$ ) <sup>ab</sup>
1 de noviembre	25.0 ( $\pm 3.0$ ) <sup>a</sup>	30.1 ( $\pm 3.5$ ) <sup>a</sup>	20.1 ( $\pm 3.1$ ) <sup>a</sup>	14.5 ( $\pm 0.4$ ) <sup>b</sup>	20.2 ( $\pm 6.2$ ) <sup>ab</sup>
1 de diciembre	23.1 ( $\pm 3.6$ ) <sup>b</sup>	28.4 ( $\pm 4.0$ ) <sup>a</sup>	18.1 ( $\pm 4.2$ ) <sup>a</sup>	13.7 ( $\pm 0.4$ ) <sup>c</sup>	18.4 ( $\pm 5.8$ ) <sup>bc</sup>
4 de enero	20.4 ( $\pm 2.4$ ) <sup>c</sup>	25.4 ( $\pm 2.4$ ) <sup>b</sup>	15.9 ( $\pm 3.8$ ) <sup>b</sup>	12.8 ( $\pm 0.3$ ) <sup>d</sup>	14.9 ( $\pm 5.6$ ) <sup>c</sup>

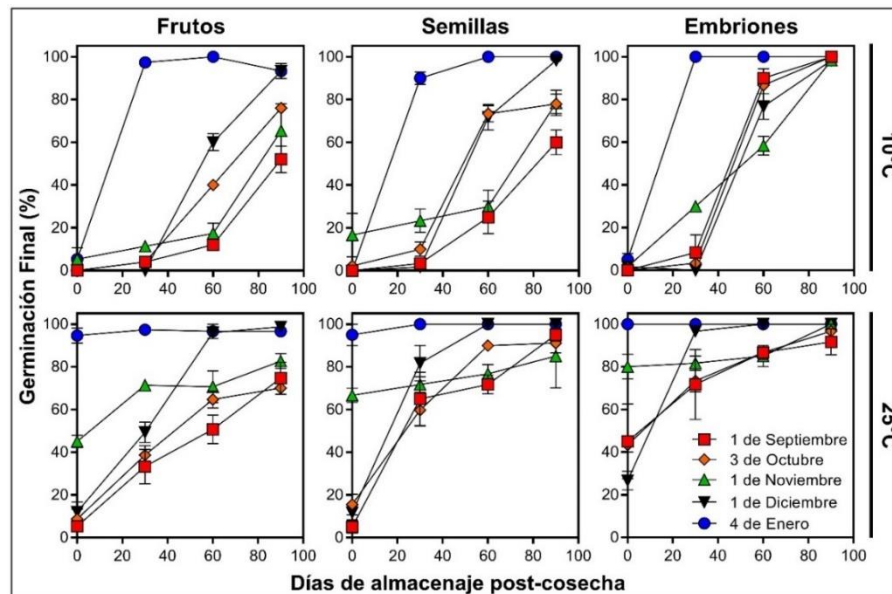
La duración del ciclo de cultivo disminuyó conforme se atrasó la FS (Fig. S2.2), en particular la fase vegetativa (Siembra–R1) y reproductiva temprana (R1–R5.5). Estas

reducciones en la duración del ciclo se asociaron a aumentos en la temperatura media experimentada por las plantas durante estos períodos ( $r$  Pearson = -0.99,  $p$ -valor<0.05) (Siembra–Antesis; Cuadro S2.2). A su vez, se observó una reducción en el rendimiento por planta con el atraso en la FS, particularmente en las dos últimas fechas de diciembre y enero (Cuadro S2.3). El peso seco del fruto fue menor en las FS de noviembre, diciembre y enero (Cuadro S2.3, Fig. S2.3), explicado por una menor (aunque no significativa) tasa de llenado en las FS más allá de octubre (Cuadro S2.3, Fig. S2.3). Las tasas de secado del fruto de las FS tempranas (de septiembre, octubre y noviembre) fueron mayores a las obtenidas en las FS tardías. De hecho, en estas últimas se observó una velocidad de secado inicial mayor y una final menor (modelo bilineal), dada por la disminución de la temperatura y radiación incidente, junto con un aumento de la humedad relativa del ambiente durante el otoño (Cuadro S2.4, Fig. S2.4).

La disminución del rendimiento observada en las FS de diciembre y enero se relacionó con un período Siembra–Antesis más corto (Cuadro S2.3, Fig. S2.2), ocasionando probablemente un menor número de flores diferenciadas en el área generativa y, por consiguiente, un menor número potencial de granos (Chimenti et al., 2001). Adicionalmente, las condiciones restrictivas de radiación durante el fin del período crítico (Cuadro S2.2), que involucra la antesis propiamente dicha y el cuaje de las flores a frutos, pudo haber incidido en un menor número final de frutos (Cantagallo y Hall, 2002; Cantagallo et al., 2004). Además, la FS de enero estuvo expuesta a temperaturas medias y niveles de radiación significativamente más bajos desde la antesis hasta la MC en comparación con el resto de las FS, en particular desde Antesis–MF (Cuadro S2.2), lo que explica, parcialmente, el menor rendimiento determinado por un menor peso de los frutos en la FS más tardía (Cuadro S2.3, Fig. S2.3).

2.3.5. Efecto de las fechas de siembra escalonadas sobre la germinación de las distintas estructuras que componen el fruto. Experimento II.

La germinación a 10 y 25 °C de frutos, semillas y embriones aumentó durante el almacenaje post-cosecha (Fig. 2.4), poniendo en evidencia la disminución en el nivel de dormición durante este período. Sin embargo, la germinación fue superior a 25°C, en concordancia con la mayor expresión de la dormición a bajas temperaturas observada en el experimento I. A medida que se retiraron las cubiertas del fruto (pericarpo y cubierta seminal), la germinación de las estructuras aumentó: los embriones germinaron más que las semillas, y éstas, más que los frutos enteros; este efecto fue más evidente a 25°C de incubación.



**Fig. 2. 4.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones en función de los días de almacenaje post-cosecha, incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior), del genotipo 1579 del Experimento II. Las líneas representan cada una de las FS: 1 de septiembre (cuadrado rojo), 3 de octubre (rombo naranja), 1 de noviembre (triángulo verde), 1 de diciembre (triángulo invertido negro) y 4 de enero (círculo azul). Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

La germinación a cosecha y la dinámica de salida de la dormición de las distintas estructuras durante el almacenaje post-cosecha respondieron en forma diferencial a la FS (Fig. 2.4). En general, tanto la germinación a cosecha como la ocurrida durante los

distintos momentos muestreados durante el almacenaje post-cosecha aumentaron con el atraso en la FS, exceptuando a la siembra de noviembre, que mostró un comportamiento más errático. Además, los frutos provenientes de plantas sembradas en enero mostraron un aumento significativo del porcentaje de germinación a ambas temperaturas de incubación en relación a lo observado con los provenientes de FS más tempranas.

A cosecha, frutos, semillas y embriones provenientes de las cinco FS evaluadas presentaron un porcentaje de germinación nulo cuando fueron incubados a 10°C. Sin embargo, a los 30 días de almacenaje post-cosecha, las tres estructuras de la FS más tardía (de enero) germinaron cerca del 100%, mientras que las de FS más tempranas mostraron valores de germinación apenas superiores al 25%. Las diferencias en la germinación de los frutos entre FS se observaron más claramente a los 60 días de almacenaje post-cosecha bajo ambas temperaturas de incubación, aunque menos evidentes a 25°C. Los frutos de la FS de enero germinaron cerca de 100% a cosecha, mientras que los de la FS de diciembre necesitaron 60 días de almacenaje post-cosecha para alcanzar el 100% de germinación. Por su parte, los frutos de las FS más tempranas alcanzaron valores cercanos al 70% de germinación a los 90 días de almacenaje.

## **2.4. Discusión**

Las variaciones en la FS afectaron el nivel de dormición de los frutos a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha. En todos los genotipos y años estudiados, los frutos provenientes de las plantas sembradas tarde en la estación de crecimiento (diciembre o enero) presentaron un nivel de dormición más bajo que los provenientes de plantas sembradas temprano (septiembre u octubre) (Fig. 2.1). En general, los frutos cosechados en FS tardías mostraron un porcentaje de germinación de frutos y embriones a 25°C mayor que los cosechados en FS tempranas (Fig. 2.1). A bajas temperaturas de incubación

(10°C), el atraso en la FS generalmente no determinó un aumento en el porcentaje de germinación, exceptuando al genotipo B91 (Fig. 2.1). Por su parte, la salida de la dormición de frutos en ambas temperaturas de incubación fue más rápida en frutos provenientes de plantas sembradas tardíamente (Fig. 2.1). Un aumento de la germinación por efecto de atrasar la FS ha sido reportado anteriormente por Bodrone et al. (2017) y Pizzorno et al. (2014) en girasol y por Jacobsen et al. (1999) y Ceccato et al. (2011) en quinoa (*Chenopodium quinoa*).

Un aspecto importante a destacar es la mayor variabilidad en el nivel de dormición observada en las FS tempranas que en las tardías (Fig. 2.1). Esto sugiere que, a la hora de fenotipar germoplasmas de girasol en base a atributos de dormición, como los empleados en este estudio (germinación a cosecha y tiempo en alcanzar determinado porcentaje de germinación durante el almacenaje), las FS deben ser tempranas, para poder identificar las diferencias entre los genotipos.

Aunque la respuesta general al atraso en la FS fue promover la germinación, se identificaron diferencias en la magnitud de la respuesta entre genotipos (Fig. 2.2, Fig. 2.3, Fig. S2.1) en lo que respecta al nivel de dormición a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha, temperaturas de expresión de la dormición y estructuras del fruto que imponen la dormición (pericarpo o embrión). Por ejemplo, todos los genotipos del grupo 2 presentaron una disminución notable del nivel de dormición a altas temperaturas de incubación a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha, como resultado del atraso en la FS (Fig. 2.3, Fig. S2.1). Por el contrario, los genotipos de los grupos 1 y 3 mostraron cambios menores en el nivel de dormición en respuesta a las variaciones en la FS, mientras que los grupos 4 y 5 mostraron una respuesta intermedia (Fig. 2.3, Fig. S2.1). En lo que respecta a la expresión de la dormición a diferentes temperaturas de incubación y la estructura que impone la dormición, la mayoría de los genotipos de los grupos 2 y 5

mostraron un alto nivel de dormición embrionaria a cosecha en ambas FS cuando se incubaron a 10°C (Fig. 2.3, Fig. S2.1). En concordancia, se observó una lenta disminución del nivel de dormición para los frutos provenientes de FS tempranas, mientras que el atraso en la FS provocó una sustancial disminución en este atributo (Fig. 2.3, Fig. S2.1). El experimento II sobre el genotipo 1579 demostró que la disminución del nivel de dormición a bajas temperaturas (que se observa como un aumento de la germinación a 10°C durante el almacenaje post-cosecha), en respuesta al atraso en la FS, se explicó principalmente por la pérdida de dormición embrionaria (Fig. 2.4; Corbineau et al., 1990), mientras que la contribución de la cubierta seminal fue menos importante. Por el contrario, un bajo nivel de dormición embrionaria desde la cosecha en ambas FS fue exhibido por los genotipos del grupo 4 (Fig. 2.3, Fig. S2.1). Sin embargo, los frutos pertenecientes a este grupo mostraron un alto nivel de dormición, lo que indica que, en estos genotipos, el pericarpo es la estructura que explicaría el nivel de dormición del fruto a cosecha en ambas FS. Dentro de este grupo, las poblaciones naturalizadas LMA y BAR mostraron una fuerte inhibición de la germinación a 25°C. Estos resultados son coherentes con los presentados por Presotto et al. (2014) y Hernández et al. (2017, 2019), que observaron un bajo porcentaje de germinación en los mismos genotipos cuando las temperaturas de incubación superaban los 15–20°C. Además, la FS tardía mostró efectos menores sobre la tasa de salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha cuando la germinación se evaluó a 25°C, lo que sugiere que la inhibición de la germinación a altas temperaturas de incubación, en estos genotipos, no sería afectada en forma significativa por variaciones en la FS. Por último, el genotipo B91 (del grupo 1; Fig. 2.3, Fig. S2.1), mostró a cosecha una disminución significativa del nivel de dormición de los frutos como resultado del atraso en la FS cuando estos se incubaron a 10°C. En forma contraria, la mayoría de los genotipos del grupo 3 presentaron un aumento

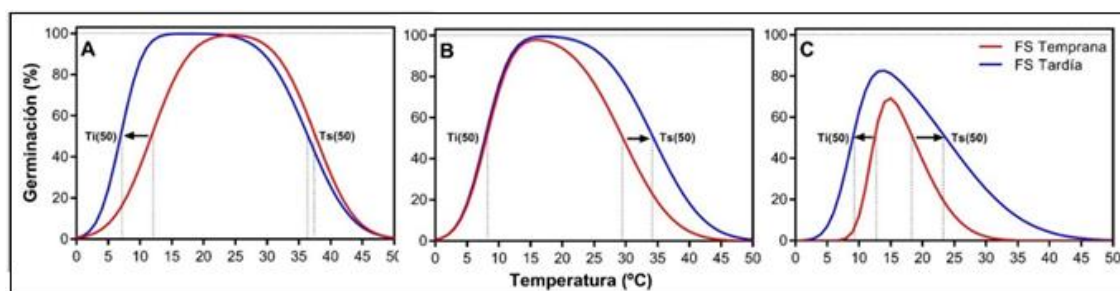


de la dormición embrionaria a cosecha a 10°C en FS tardías (Fig. 2.3, Fig. S2.1). Resultados similares al encontrado en el grupo 3 fueron documentados por Bodrone et al. (2017) en un híbrido comercial de girasol sembrado en dos FS contrastantes.

Para ilustrar los cambios en el rango térmico permisivo para la germinación como consecuencia de atrasos en la FS, se estimaron las temperaturas límite inferior ( $T_{i(50)}$ ) y superior ( $T_{s(50)}$ ) para la germinación, según Batlla y Benech-Arnold (2015) (ver *Desarrollo y validación de modelos* en Anexo; Cuadro S2.5, Fig. S2.5) para FS tempranas y tardías. Este análisis se realizó para algunos genotipos (1552, 1579 y AAL) en los que las pruebas de germinación se ensayaron a varias temperaturas de incubación en el primer año experimental (15/16, ver sección 2.2.3. *Ensayos de germinación*). En todos los casos el atraso en la FS determinó una ampliación del rango térmico permisivo para la germinación. Sin embargo, la magnitud y dirección de cambio (hacia bajas o altas temperaturas de incubación) difirió entre genotipos (Fig. 2.5). En el genotipo 1552, para frutos evaluados 30 días después de la cosecha (Fig. 2.5A, Cuadro S2.5, Fig. S2.5), los cambios fueron principalmente consecuencia de cambios en  $T_{i(50)}$ , es decir, los frutos provenientes de FS tardías adquirieron la capacidad de germinar a temperaturas más bajas. Lo contrario se observó en el genotipo 1579 (Fig. 2.5B, Cuadro S2.5, Fig. S2.5), en donde el aumento del rango en las FS tardías fue consecuencia de una mayor  $T_{s(50)}$  (es decir, aumentó la capacidad de germinar a mayores temperaturas). Por otro lado, en la población silvestre AAL (Fig. 2.5C, Cuadro S2.5, Fig. S2.5) un atraso en la FS determinó una ampliación del rango térmico por una menor  $T_{i(50)}$  y una mayor  $T_{s(50)}$ . El atraso en la

FS no sólo afectó el rango térmico permisivo para la germinación de los frutos, sino también la velocidad de germinación de los mismos. Menores valores de tiempo térmico ( $\theta T_{(50)}$ ) y de su distribución estándar ( $\sigma \theta T_{(50)}$ ) (Cuadro S2.5) fueron determinados en FS tardías. Menores valores de estos parámetros determinan una germinación más rápida y uniforme que garantizaría una sincronización adecuada de la emergencia de las plántulas en el campo.

El atraso en la FS expuso a los frutos a una menor temperatura, radiación y fotoperiodo durante su desarrollo en la planta madre (Cuadro 2.2, Cuadro 2.4) determinando menores niveles de dormición (Fig. 2.1, Fig. 2.3, Fig. 2.4, Fig. S2.1). Sin embargo, los resultados del experimento II mostraron que la disminución en el nivel de dormición fue más evidente en FS de diciembre y enero (en este último caso aún más marcada la disminución) en comparación con las FS más tempranas (Fig. 2.4). Esta respuesta a la FS, se correlaciona con el patrón de cambio en las condiciones ambientales durante el desarrollo de los frutos con el atraso en la FS, en la que las variables ambientales fueron similares entre septiembre y noviembre y mostraron una marcada disminución en diciembre y enero (Cuadro 2.4, Cuadro S2.2). Trabajos previos realizados por Rodríguez et al. (2001) en cebada y Bodrone et al. (2017) en girasol sugirieron que el

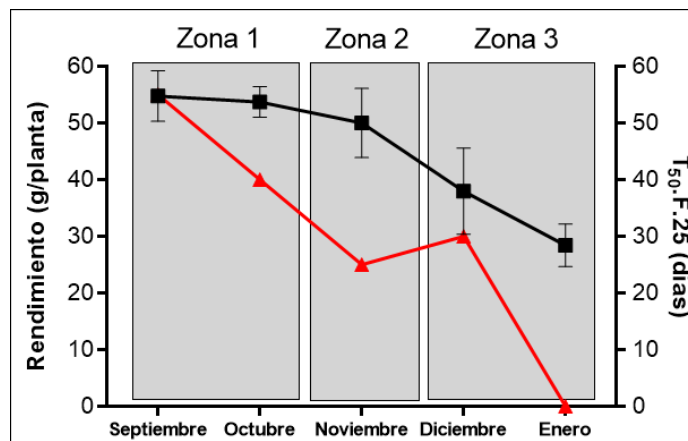


**Fig. 2. 5.** Fracción germinativa de los frutos en el rango térmico 0–50°C para 1552 (A), 1579 (B) y AAL (C) a los 30 días de almacenaje post-cosecha (año 15/16, Experimento 1). Las líneas rojas representan las FS tempranas y las azules las FS tardías. Las flechas en cada panel indican hacia qué dirección se corren los límites inferior [ $T_{i(50)}$ ] y/o superior [ $T_{s(50)}$ ] con el atraso en la FS. Los valores medios de  $T_i$ ,  $T_s$  y  $\theta T$ , con sus desviaciones estándar se muestran en la Cuadro S2.5 y las curvas de germinación observadas y simuladas por el modelo se presentan en la Fig. S2.5. Las simulaciones se realizaron según el modelo matemático propuesto por Batlla y Benech-Arnold (2015). Los supuestos del modelo se encuentran en las notas suplementarias al capítulo 2 (ver Desarrollo y validación de modelos).

nivel de dormición a cosecha está regulado principalmente por la temperatura experimentada por las semillas durante las últimas etapas del desarrollo de las mismas en la planta madre. Las variables ambientales registradas desde la MF hasta la MC mostraron una correlación negativa y significativa (Cuadro S2.6) con la germinación de frutos a 10 y 25 °C a 60 días de almacenaje post-cosecha (donde se observó una mayor variabilidad entre FS; Fig. 2.4), mientras que no se observó ninguna correlación para las variables ambientales registradas durante el período de Antesis–MF. Esto apoya la hipótesis de que la regulación ambiental de la dormición puede tener lugar en etapas posteriores del desarrollo de la semilla (es decir, después de la MF). Sin embargo, el diseño experimental realizado aquí no permitió distinguir adecuadamente el/los factor/es responsable/s de la dormición, ya que los factores ambientales correlacionan entre sí.

La industria semillera requiere de semillas de alta calidad (que germinen en un amplio rango de temperaturas) poco después de la cosecha, para su acondicionamiento y embolsado. El alto nivel de dormición dificulta la comercialización y aumentan los costos de almacenaje y procesos de ruptura de la dormición. Con la dormición persistente durante el almacenaje post-cosecha, también se ven amenazadas tareas como la sincronización de floración para producir híbridos. Los resultados presentados en este capítulo demuestran que el manejo de la FS genera lotes de semillas con un menor nivel de dormición y mayor velocidad de germinación (Fig. 2.5, Cuadro S2.5, Fig. S2.5). Sin embargo, el atraso en la FS también provoca una disminución del rendimiento por planta (Cuadro S2.3). Surge entonces el interrogante de hasta qué punto es posible lograr lotes de semillas con un bajo nivel de dormición atrasando la FS sin perder cantidades significativas de rendimiento. Para ilustrar esta cuestión, se graficaron los rendimientos y los  $T_{50.F.25}$  (ver sección 2.3.2. *Análisis de los componentes principales*) (Fig. 2.6); este último parámetro mostró un patrón de cambio más gradual con el atraso en la FS que los

datos observados en la Fig. 2.4. Los resultados obtenidos se pueden dividir en tres zonas (Fig. 2.6). En la zona 1, se obtienen los mayores rendimientos, pero con un alto nivel de dormición de los frutos. En la zona 2, pequeñas reducciones en el rendimiento van acompañadas de una importante reducción en el nivel de dormición. Por último, la zona 3 muestra que un nivel más bajo de dormición se corresponde con los rendimientos significativamente más bajos (Cuadro S2.3). Este análisis sugiere que es posible manejar la FS para obtener lotes de semillas más despiertas que (i) requieran un menor tiempo de almacenamiento para su procesamiento y embolsado sin pérdidas significativas en el rendimiento o (ii) aseguren lo antes posible la emergencia de plántulas para lograr sincronizar los tiempos de floración entre las plantas macho y hembra.



**Fig. 2. 6.** Rendimiento por planta (en gramos, línea negra) y tiempo (en días) para alcanzar el 50% de la germinación de frutos ( $T_{50.F.25}$ , línea roja) a 25°C en función de la FS. Se presentan valores medios ( $\pm$ EE,  $n=3$ ) de rendimiento, mientras que el  $T_{50.F.25}$  se estimó mediante interpolación lineal (ver sección 2.2.4. Análisis estadístico). Tres zonas fueron marcadas según el rendimiento y el nivel de dormición. Estos datos corresponden al Experimento II.

## **CAPÍTULO 3. Efecto de la fecha de siembra sobre el nivel de dormición en frutos de girasol. Estudio de los mecanismos fisiológicos involucrados**

### **3.1. Introducción**

En el capítulo 2 se estudió el efecto del atraso en la FS sobre el nivel de dormición de los frutos en una amplia gama de genotipos de girasol. En el presente capítulo, se profundizará en el estudio de los mecanismos fisiológicos involucrados en los cambios en el nivel de dormición de los frutos causados por variaciones en la FS. Para ello se utilizaron dos genotipos que evidenciaron (a) cambios significativos en el nivel de dormición ante cambios en la FS en el año 15/16 (genotipos 1552 y 1579; Cuadro 2.1) y (b) expresión de la dormición a diferentes temperaturas de incubación (1552 a bajas y 1579 a altas temperaturas) (Fig. S2.1 grupo 3).

El nivel de dormición de una semilla o fruto está principalmente determinado por el balance entre dos hormonas: el ABA, que actúa promoviendo la dormición y las GAs, que la reduce (Bewley et al., 2013). La regulación de la dormición a través de estas hormonas se establece tanto, por variaciones en el contenido como en la sensibilidad de los tejidos a la acción de las mismas (Hilhorst, 1995; Steinbach et al., 1997; Koornneef et al., 2002; Kermode, 2005; Feurtado y Kermode, 2007). La evidencia disponible en girasol demuestra que el ABA es necesario para inducir la dormición de los embriones en desarrollo a través de un pico en el contenido endógeno de la hormona alrededor de los 13–15 días luego de la antesis (Le Page-Degivry et al., 1990). Una vez inducida la dormición primaria, el mantenimiento de la misma durante el desarrollo del fruto estaría determinado por la capacidad de síntesis de ABA de los embriones (Le Page-Degivry y Garello, 1992). Por otro lado, en frutos y embriones maduros (es decir, secos), las evidencias disponibles sugieren que la sensibilidad a la inhibición de la germinación por el ABA exógeno sería el mecanismo responsable de mantener la dormición luego de la

cosecha, sin observarse cambios en el contenido de ABA o síntesis de ABA *de novo* de los embriones durante esta etapa (Bianco et al., 1994; Le Page-Degivry et al., 1996; Rodríguez et al., 2018). Esta sensibilidad disminuye conforme los frutos van perdiendo la dormición durante la post-cosecha (Rodríguez et al., 2018). A su vez, con el avance de la madurez de los frutos en la planta madre, disminuye el nivel de dormición de los embriones durante el almacenaje post-cosecha, aumentando su sensibilidad a las GAs (Le Page-Degivry et al., 1996). Otra de las hormonas que podría estar involucrada en la ruptura de la dormición es el etileno. En numerosas especies se ha reportado un efecto promotor de la germinación por etileno. Esta hormona estaría actuando a través de la inhibición de la señalización (Arc, 2013) y síntesis de ABA (Corbineau et al., 1988, Corbineau et al., 2014). Específicamente en girasol, se ha demostrado que la presencia del pericarpo y el ABA reducen la conversión del precursor ACC a etileno, disminuyendo la germinación de los frutos (Corbineau et al., 1989).

A pesar de que se conoce en detalle, a escalas moleculares y genéticas, cómo estas hormonas y los genes que se expresan se relacionan con el nivel de dormición, el efecto del AM sobre dicha regulación ha sido escasamente estudiado. En trabajos donde se analizó el efecto ambiental sobre el nivel de dormición en semillas de cebada asociados a cambios en la latitud, se observó que las semillas producidas en España (mayores temperaturas y déficit hídrico durante el llenado de la semilla) presentaron un mayor porcentaje de germinación (es decir, menor nivel de dormición) que las producidas en Escocia. Esta menor dormición se asoció a una menor sensibilidad al ABA y no a un menor nivel endógeno de ABA en frutos maduros (Romagosa et al., 2001). Los cambios en la latitud y/o en la FS producen variaciones en la temperatura, en el fotoperíodo y en el nivel de radiación incidente que exploran las semillas durante su desarrollo en la planta madre, afectando el nivel de dormición de las mismas. Trabajos realizados por Contreras

(2007) estudiaron el efecto del fotoperíodo sobre la dormición en semillas de lechuga. Fotoperíodos más largos aumentaron el nivel de dormición de las semillas, lo que estuvo asociado a un mayor contenido de ABA y mayor sensibilidad de las semillas al agregado exógeno de esta hormona. Sin embargo, en girasol, estudios realizados por Pizzorno (2021) concluyeron que la extensión del fotoperíodo durante el desarrollo de los frutos no produce cambios significativos en el nivel de dormición a cosecha. En relación a los otros factores que podrían cambiar con la FS, como la temperatura y la radiación, se observó que el aumento de la temperatura y la disminución de la radiación durante el llenado disminuyen, en general, el nivel de dormición de las semillas a cosecha (Maun y Cavers, 1971; Walker-Simmons y Sessing, 1990; Saranga et al., 1998; Garello y Le Page-Degivry, 1999; Steadman et al., 2004; Frascaroli et al., 2005; Sung et al., 2008; Contreras et al., 2009; Kendall et al., 2011; Gallagher et al., 2013; He et al., 2014; Barrero et al., 2020; Chen et al., 2020). En forma contraria a lo observado en la mayoría de las especies, en girasol aumentos en la temperatura aumentan el nivel de dormición de los frutos, lo que estaría determinado por variaciones en la sensibilidad al ABA de los frutos (Bodrone et al., 2017). Los efectos particulares de la temperatura y de la radiación durante el desarrollo como factores que modulan el nivel de dormición de los frutos y los mecanismos hormonales asociados a esta respuesta se abordarán en los capítulos 4 y 5 respectivamente.

El efecto del AM sobre la dormición de las semillas se asoció en varias especies y contextos a cambios estructurales y químicos de las cubiertas, como cambios en el espesor y en el contenido de compuestos que inhiben la germinación (Bewley et al., 2013). En *Chenopodium quinoa*, *Amaranthus hybridus* y girasol, atrasos en la FS generaron semillas con cubiertas más finas y con un menor nivel de dormición que las provenientes de FS tempranas (Ceccato et al., 2015, Fernández Farnoccia et al., 2021;

Pizzorno, 2021). En el caso del girasol se sabe que las cubiertas limitan el suministro de O<sub>2</sub> al embrión, lo que podría estar modulando la dormición de los frutos (Borisjuk y Rolletschek, 2009). La condición de hipoxia a la que está expuesto el embrión dentro de la semilla o fruto puede afectar la tasa de catabolización y/o señalización del ABA o de otros inhibidores de la germinación (Barthe et al., 2000; Benech-Arnold et al., 2006; Mendiondo et al., 2010; Domínguez et al., 2019). Más allá de estas evidencias, se desconoce si el ambiente en el que maduran las semillas puede afectar el nivel de hipoxia al que están expuestos los embriones, la sensibilidad de los embriones a esta condición de hipoxia, y cómo esta condición podría interactuar con los mecanismos hormonales que regulan el nivel de dormición.

En base a lo expuesto, el objetivo de este capítulo fue estudiar los mecanismos fisiológicos que determinan las variaciones en el nivel de dormición de los frutos de girasol ante variaciones en la FS. Para ello se establecieron los siguientes objetivos parciales: (i) estudiar el efecto del atraso en la FS sobre la germinación en desarrollo, a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha de frutos, semillas y embriones en dos genotipos de girasol y (ii) evaluar si los cambios en el nivel de dormición causados por variaciones en la FS están relacionados con cambios en (a) el nivel endógeno de ABA durante el desarrollo, (b) la capacidad de los embriones de sintetizar ABA durante el desarrollo tardío del fruto, (c) la sensibilidad al ABA, GAs y etileno, (d) la sensibilidad de las distintas estructuras del fruto a la hipoxia y si esta condición afecta la sensibilidad de los embriones al ABA, (e) la anatomía del pericarpo y (f) el potencial de crecimiento del embrión.

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Sitio de los ensayos, material vegetal y fechas de siembra.**



Se llevaron a cabo ensayos a campo sembrando cultivos de girasol en FS contrastantes con el objetivo de exponer a las plantas a distintas condiciones ambientales durante su ciclo, particularmente durante la etapa de desarrollo de los frutos. Los experimentos se realizaron en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (34°25' S, 58°25' O) y se utilizaron dos líneas endocriadas: 1552 y 1579 (ver *Cuadro 2.1*). El genotipo 1552 se evaluó en tres temporadas: 2016/2017 (1 de septiembre–FS temprana y 4 de enero–FS tardía), 2017/2018 (10 de octubre–FS temprana y 4 de enero–FS tardía) y 2018/2019 (18 de septiembre–FS temprana y 8 de enero–FS tardía). Por su parte, el genotipo 1579 fue sembrado en las campañas 2017/2018 y 2018/2019, en las mismas FS que el genotipo 1552.

### 3.2.2. Condiciones generales de los ensayos a campo.

La conducción del ensayo se realizó de manera similar a lo descrito en el capítulo 2. Brevemente, el diseño de los experimentos fue completamente aleatorio con tres repeticiones (50 plantas por parcela). La densidad de siembra fue de 5 plantas m<sup>-2</sup> y la distancia entre hileras de 0.52 m. Las plantas fueron fertilizadas con fósforo y nitrógeno, regadas por un sistema de riego por goteo, y mantenidas libres de plagas, enfermedades y malezas. Se registró la fenología de las plantas en los estadios reproductivos (Schneiter y Miller, 1981). En R4, antes de la apertura de las flores, los capítulos fueron cubiertos con bolsas de poliamida para evitar el intercambio de polen entre los distintos materiales. Plantas que no difirieron en más de dos días en su fecha de antesis fueron agrupadas. La polinización se realizó diariamente de manera manual mediante el uso de pinceles. A partir de los diez días desde la antesis hasta la MC (11% de humedad) se tomaron muestras de frutos para determinar la dinámica del peso fresco y seco. En MC los capítulos se cortaron

y trillaron manualmente. Sólo se seleccionaron para los ensayos de germinación los frutos provenientes del tercio medio de los capítulos. El secado de los frutos luego de la cosecha se realizó según la metodología explicada en la *sección 2.2.2.* (capítulo 2). Los frutos provenientes de cada una de las parcelas fueron agrupados en un “pool” y almacenados en una atmósfera seca a 25°C. Tres capítulos por parcela fueron apartados para determinar el rendimiento por planta. Las plantas se fertilizaron con fósforo a la siembra y con nitrógeno en V4, y se regaron mediante un sistema de riego por goteo. Se aplicaron fungicidas e insecticidas para mantener la sanidad. Los datos meteorológicos fueron registrados por una estación meteorológica ubicada en el sitio experimental (Davis Vantage Pro2).

### 3.2.3. Ensayos de germinación.

#### 3.2.3.1. Momentos de muestreo.

Se realizaron muestreos de frutos durante la etapa de desarrollo de los frutos (70%, 65%, 60%, 55%, 40% y 25% de humedad de los frutos; estos momentos de muestreo dependieron del año evaluado y del genotipo), a cosecha (luego del secado a 6% de humedad) y a intervalos regulares de aproximadamente 30–50 días durante el almacenaje post-cosecha. En los muestreos durante el desarrollo de los frutos se cosecharon 5 capítulos por repetición. Los muestreos denominados “a cosecha” se realizaron aproximadamente 6–7 días luego de la trilla de los frutos, que fue lo que demandó, en promedio, el proceso de limpieza y secado de los frutos.

#### 3.2.3.2. Características de los ensayos de germinación.

Se colocaron 25 frutos (frutos enteros), 20 semillas (sin el pericarpo) y 20 embriones (sin pericarpo ni cubierta seminal) en placas de Petri de 9 cm de diámetro (n=3) sobre dos discos de papel de filtro humedecidos con 5 ml de agua destilada o con soluciones de distintas concentraciones de hormonas (ABA, GAs y etileno en forma de

etefón) según corresponda. En las soluciones de ABA se incluyó un inhibidor de síntesis de ABA, fluridone (Pestanal ®, estándar analítico, SIGMA-ALDRICH), en una concentración de 100µM (de ahora en más, “F100”). La razón de la inclusión de dicho inhibidor fue la de prevenir cambios en el contenido endógeno de ABA de los embriones (debido a la síntesis) durante la incubación en concentraciones fijas de ABA (Bodrone et al., 2017). Además, se incubaron frutos y embriones en soluciones con inhibidores de síntesis de GA (paclobutrazol 100µM, trinexapac ethyl 500µM y prohexadione-CA 100 µM) para evaluar la posible síntesis de GA durante la incubación. Las temperaturas de incubación fueron 10 y 25 °C y el tiempo de incubación 15 días. Los recuentos de germinación se llevaron a cabo cada dos días, y cada unidad germinada fue retirada de la placa de Petri. El método de extracción de semillas y embriones, y el criterio de germinación registrada en cada una de las estructuras se realizó según la metodología explicada en la *sección 2.2.3* (capítulo 2).

#### 3.2.4. Determinación del contenido endógeno y la capacidad de síntesis de ABA durante el desarrollo de los frutos.

Con el objetivo de determinar la dinámica del contenido de ABA de los embriones durante el desarrollo del fruto en la planta madre, se muestrearon frutos (15) provenientes de las distintas FS y genotipos en distintos momentos durante el desarrollo del fruto y a cosecha. A los frutos muestreados se les retiró el pericarpio y la cubierta seminal, quedando el embrión aislado. En el genotipo 1552, la determinación del contenido de ABA se realizó en el embrión entero, mientras que en el 1579 se realizó sobre el eje embrionario. Los embriones y ejes embrionarios fueron congelados en nitrógeno líquido, liofilizados, pesados y molidos para la extracción acuosa de ABA. Luego, a cada muestra se le agregó agua destilada (100:1 v/p) y se la dejó durante toda la noche sobre un agitador

a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 4 minutos y se analizaron 50 µl del sobrenadante por muestra por radioinmunoensayo usando un anticuerpo monoclonal AFR MAC 252 (Quarrie et al., 1988), y ABA tritiado (Amersham Biosciences, Reino Unido), como se describe en Steinbach et al. (1995). Se calculó la media y el EE (n=3, cada repetición biológica evaluada en dos réplicas técnicas), y los datos se expresaron en pg ABA mg<sup>-1</sup> PS de la muestra original. En cada muestreo se determinó el porcentaje de humedad de los frutos mediante la metodología explicada en el capítulo 2 (*sección 2.2.2.*).

Con el objetivo de determinar la capacidad de síntesis de ABA de los embriones se muestrearon frutos (15) en distintos momentos del desarrollo, incubados a 25°C en agua y F100 (n=3). Para el genotipo 1552, los frutos se muestrearon con 55% de humedad (2016/2017) y 45% de humedad (2017/2018), mientras que para el genotipo 1579, el muestreo se realizó con frutos de 35% de humedad (2017/2018). Los momentos de muestreo durante la incubación fueron a las 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h, dependiendo del año y del genotipo evaluado. De los frutos muestreados se extrajeron los embriones o ejes embrionarios que fueron congelados, liofilizados y molidos. Para determinar el contenido de ABA se siguió el mismo procedimiento explicado en el párrafo anterior. La capacidad de síntesis de ABA durante la incubación (*de novo*) se determinó como la diferencia entre el contenido de ABA de los embriones o ejes incubados en agua y en F100 (Le Page-Degivry y Garello, 1992). Paralelamente se monitoreó la germinación de frutos y embriones incubados a 25°C. En todos los casos las determinaciones se realizaron antes de que comience la germinación.

### 3.2.5. Determinación de la anatomía del pericarpo.

Frutos recién cosechados se fijaron en FAA durante 48 h, se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes, se clarificaron con xilol y se incluyeron en parafina pura. Se obtuvieron cortes seriados de 10–15µm de espesor mediante el empleo de un micrótopo rotativo de Minot. Los materiales se tiñeron con la doble coloración safranina–fastgreen que permite distinguir pared celular primaria y secundaria y se realizó un montaje definitivo con Bálsamo de Canadá. Finalmente, los preparados histológicos se observaron y fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (Zeiss, Axioplan). Las mediciones de ancho del pericarpo se llevaron a cabo a partir de microfotografías digitales utilizando el programa Image Tool (Wilcox et al., 2002). Estas determinaciones fueron realizadas en la Cátedra de Botánica General de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Esta determinación se realizó en frutos provenientes de ambas FS y genotipos en el año 18/19.

#### 3.2.6. Germinación de frutos, semillas y embriones en hipoxia.

Frutos y semillas fueron incubados a 25°C bajo concentraciones de oxígeno de 3 y 21%. La incubación de estas estructuras a concentraciones menores de 21% O<sub>2</sub> (es decir, en condiciones de hipoxia) se realizó con el objetivo de evaluar en forma indirecta el efecto de la presencia de las cubiertas del fruto (pericarpo y cubierta seminal) sobre la imposición de la dormición a través de una restricción en la difusión de oxígeno al embrión (Rolletschek et al., 2007). A su vez, para evaluar el efecto de la hipoxia sobre la sensibilidad al ABA de los embriones se incubaron embriones a 3 y 21% de O<sub>2</sub> en combinación con dosis crecientes de ABA (1, 5, 10 y 50µM). En todos los casos, triplicados de 20 unidades de frutos, semillas o embriones fueron incubadas en bandejas plásticas (9 cm de ancho x 6 cm de profundidad x 4 cm de alto) sobre un disco de papel

de filtro con una capa de algodón debajo, humedecido con 50 ml de agua destilada o de solución de ABA.

Para disminuir la concentración de oxígeno atmosférico (21%) las bandejas con semillas fueron colocadas dentro de una cámara plástica transparente semipermeable (35 cm de ancho x 30 cm de profundidad x 15 cm de alto, con agua en la base, Modelo C-274, BioSpherix, Estados Unidos) conectada a un controlador de oxígeno (PRO-OX Modelo 110, BioSpherix, Estados Unidos). Las semillas sometidas a la concentración de oxígeno atmosférico fueron colocadas en cajas plásticas similares dentro de la cámara. El recuento de germinación se realizó a los 7 días de incubación. Esta determinación se realizó en frutos y semillas provenientes de ambas FS y genotipos en el año 17/18 a los 120 días desde la cosecha; y en embriones de la campaña 18/19 a los 40 días de almacenaje post-cosecha.

### 3.2.7. Determinación del potencial de crecimiento del embrión.

Veinte embriones (n=3) se incubaron en una solución de PEG6000 que fue equivalente a un potencial osmótico de -1.5MPa (según la ecuación determinada por Michel, 1983). Los embriones fueron transferidos diariamente a soluciones frescas de PEG con el fin de evitar variaciones en el potencial osmótico del medio de incubación, sin realizar ningún lavado de los mismos previo a la transferencia. Se realizaron conteos diarios de germinación, hasta alcanzar un claro plateau. Para esta determinación se utilizaron embriones de 40 días de almacenaje post-cosecha, provenientes de ambas FS y genotipos en el año 18/19.

### 3.2.8. Análisis estadísticos.

La caracterización del ambiente explorado por los cultivos, el rendimiento, los subcomponentes del peso seco del fruto, el contenido de ABA y el espesor de pericarpo se analizaron mediante un análisis de la varianza y un test de comparaciones de medias (Tukey), con un nivel de significancia del 5%. Dicha comparación se realizó por genotipo. La evolución del peso seco del fruto y de la pérdida de humedad del mismo se ajustó a los modelos explicados en el capítulo 2 (*sección 2.2.4*). Se presentan los valores medios y los EE de la germinación final (luego de los 15 días de incubación). En los casos donde se requirió hacer inferencia estadística en los datos de germinación, se llevaron a cabo análisis no paramétricos (Kruskal–Wallis), con un nivel de significancia del 5%, ya que los registros de germinación no se distribuyen normalmente. Los softwares utilizados fueron Infostat (Di Rienzo et al., 2012) y GraphPad Prism 7 (Motulsky, 2003).

### **3.3. Resultados**

#### *3.3.1. Caracterización del ambiente explorado por las plantas durante el desarrollo de los frutos.*

Tal como se observó en el capítulo 2, el atraso en la FS provocó una disminución en las temperaturas medias, máximas y mínimas diarias, en el fotoperíodo promedio diario y en la radiación incidente media diaria, experimentada por las plantas durante todo el ciclo del cultivo (Cuadro 3.1, Cuadro S3.1). Más allá de las diferencias observadas entre años, las plantas sembradas en fechas tardías experimentaron una disminución promedio de 4.0°C, 4.1°C y 3.6°C en las temperaturas media, máxima y mínima, respectivamente, y de 2.4 h y 7.5MJ m<sup>-2</sup> en el fotoperíodo medio y la radiación incidente media, respectivamente, durante el período de desarrollo de los frutos en la planta madre (entre Antesis y MC).

**Cuadro 3. 1.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas en el período Antesis–MC según FS, genotipo y año. Letras distintas indican diferencias significativas entre FS y año ( $p$ -valor $<$ 0.05). Las comparaciones se realizaron por genotipo. **Abreviaturas:** TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en  $^{\circ}$ C; Fp (h): Fotoperíodo medio, en horas; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en  $\text{MJ m}^{-2}$ .

	<b>TMd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>TMMxd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>TMMnd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Fp (h)</b>	<b>RIMd (<math>\text{MJ m}^{-2}</math>)</b>
<b>1552</b>					
16/17 - 1 de septiembre	23.9 ( $\pm$ 2.9) <sup>ab</sup>	29.6 ( $\pm$ 3.1) <sup>ab</sup>	18.4 ( $\pm$ 3.8) <sup>ab</sup>	15.3 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	23.6 ( $\pm$ 7.2) <sup>a</sup>
16/17 - 4 de enero	20.1 ( $\pm$ 2.7) <sup>cd</sup>	25.1 ( $\pm$ 2.7) <sup>de</sup>	15.5 ( $\pm$ 3.8) <sup>c</sup>	12.7 ( $\pm$ 0.4) <sup>bc</sup>	14.8 ( $\pm$ 5.3) <sup>c</sup>
-----					
17/18 - 10 de octubre	25.1 ( $\pm$ 3.2) <sup>a</sup>	30.7 ( $\pm$ 4.0) <sup>a</sup>	19.8 ( $\pm$ 3.1) <sup>a</sup>	15.1 ( $\pm$ 0.3) <sup>a</sup>	25.6 ( $\pm$ 7.4) <sup>a</sup>
17/18 - 4 de enero	21.3 ( $\pm$ 3.2) <sup>c</sup>	26.7 ( $\pm$ 3.9) <sup>cd</sup>	16.4 ( $\pm$ 3.6) <sup>bc</sup>	12.9 ( $\pm$ 0.5) <sup>b</sup>	18.3 ( $\pm$ 5.9) <sup>bc</sup>
-----					
18/19 - 18 de septiembre	23.2 ( $\pm$ 2.6) <sup>b</sup>	27.9 ( $\pm$ 2.8) <sup>bc</sup>	18.6 ( $\pm$ 3.1) <sup>a</sup>	15.3 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	22.2 ( $\pm$ 8.7) <sup>ab</sup>
18/19 - 8 de enero	19.3 ( $\pm$ 2.7) <sup>d</sup>	24.5 ( $\pm$ 3.2) <sup>e</sup>	14.7 ( $\pm$ 3.5) <sup>c</sup>	12.7 ( $\pm$ 0.4) <sup>c</sup>	16.4 ( $\pm$ 4.2) <sup>c</sup>
<b>1579</b>					
17/18 - 10 de octubre	25.1 ( $\pm$ 3.0) <sup>a</sup>	30.8 ( $\pm$ 3.5) <sup>a</sup>	19.8 ( $\pm$ 3.2) <sup>a</sup>	14.8 ( $\pm$ 0.4) <sup>b</sup>	25.6 ( $\pm$ 6.3) <sup>a</sup>
17/18 - 4 de enero	21.3 ( $\pm$ 3.0) <sup>b</sup>	26.4 ( $\pm$ 3.7) <sup>c</sup>	16.7 ( $\pm$ 3.6) <sup>b</sup>	12.7 ( $\pm$ 0.5) <sup>c</sup>	16.7 ( $\pm$ 6.6) <sup>b</sup>
-----					
18/19 - 18 de septiembre	24.3 ( $\pm$ 2.7) <sup>a</sup>	28.9 ( $\pm$ 3.0) <sup>b</sup>	19.6 ( $\pm$ 3.0) <sup>a</sup>	15.1 ( $\pm$ 0.3) <sup>a</sup>	23.1 ( $\pm$ 7.6) <sup>a</sup>
18/19 - 8 de enero	19.3 ( $\pm$ 2.7) <sup>c</sup>	24.6 ( $\pm$ 3.2) <sup>d</sup>	14.7 ( $\pm$ 3.5) <sup>c</sup>	12.6 ( $\pm$ 0.4) <sup>c</sup>	16.2 ( $\pm$ 4.2) <sup>b</sup>

### 3.3.2. *Llenado y secado del fruto.*

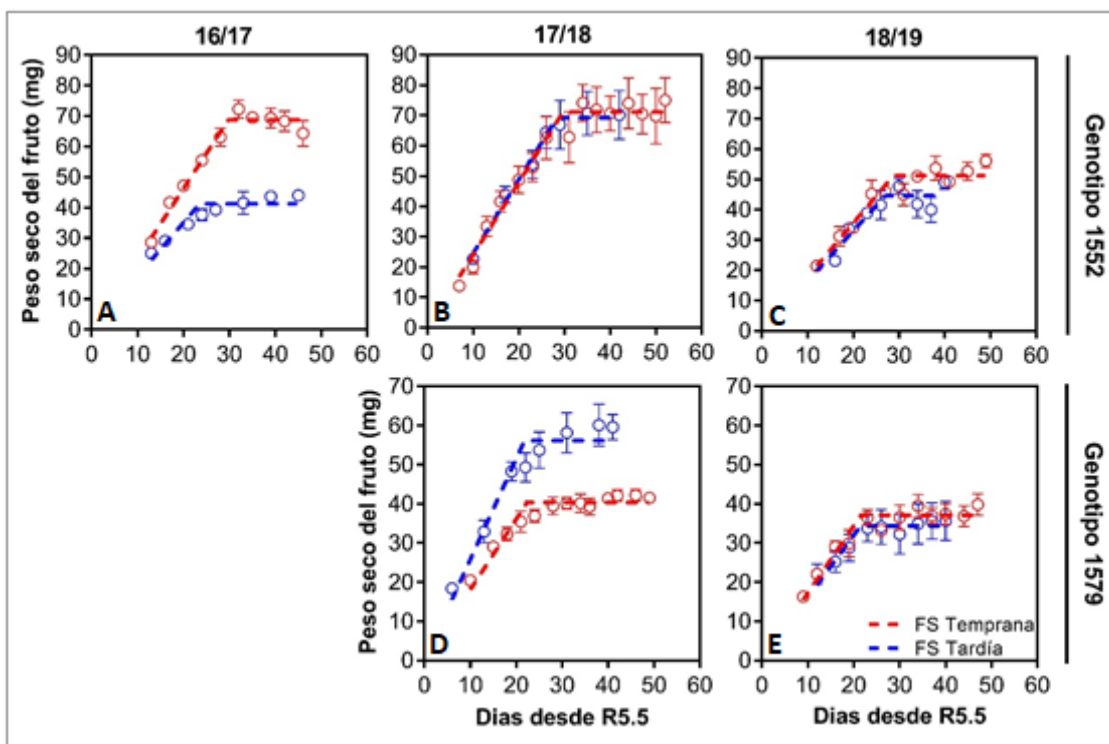
Los cambios en las variables ambientales producto de las diferentes FS determinaron modificaciones en la duración de las etapas ontogénicas del cultivo (Fig. S3.1). En líneas generales se observó una reducción de las etapas Siembra–R5.5 y R5.5–MF, y un aumento de la etapa MF–MC con el atraso en la FS. La menor duración de la etapa vegetativa en las FS tardías estaría determinada por una mayor tasa de desarrollo asociada a mayores temperaturas y fotoperíodos largos (Siembra–R5.5; Cuadro S3.1; Andrade, 1995; d'Andria et al., 1995; de la Vega et al., 2002a). Por el contrario, la mayor duración de la etapa MF–MC estuvo asociada a una disminución en la temperatura media diaria y radiación incidente durante esta etapa. Esto determinó, sumado a mayores precipitaciones en la mayoría de los años, un secado más lento de los frutos en la planta madre (Fig. 3.2), y un incremento de la duración de esta etapa (MF–MC; Cuadro S3.1).



El rendimiento por planta siempre fue menor en las FS tardías (Cuadro S3.2), probablemente por un menor número de frutos finales por planta. Este comportamiento se puede explicar por: (i) aumentos en la temperatura durante la fase de diferenciación de flores que determinaron un menor número potencial de frutos (Cuadro S3.1; Chimenti et al., 2001) y (ii) menores niveles de radiación incidente explorados durante el periodo crítico de determinación del rendimiento (cuaje) que redujeron el número final de frutos (Cuadro S3.1; Cantagallo y Hall, 2002; Cantagallo et al., 2004).

No se observó un patrón consistente de variación en el peso de los frutos en relación a la FS a través de los años para los dos genotipos evaluados (Fig. 3.1). Para el genotipo 1552, en el año 16/17 y 18/19 (Fig. 3.1A, Fig. 3.1C), los frutos provenientes de FS tardías fueron más livianos que los de las FS tempranas (Cuadro S3.2). Esta respuesta se asoció a una menor duración del llenado en el año 16/17 y a una menor tasa de llenado en el año 18/19 (Cuadro S3.2). Esto estuvo relacionado al menor nivel de radiación incidente que exploraron las plantas durante esta etapa (R5.5–MF; Cuadro S3.1). Por su parte, condiciones menos contrastantes entre FS (R5.5–MF; Cuadro S3.1) pueden haber determinado que los pesos secos finales de los frutos no difieran en el año 17/18 (Fig. 3.1B, Cuadro S3.2). El genotipo 1579 en el año 17/18 (R5.5–MF; Fig. 3.1D, Cuadro S3.1) presentó un mayor peso de los frutos en la FS tardía, lo que se explicó por una mayor tasa de llenado (Cuadro S3.2). Finalmente, para este genotipo, no se observaron diferencias significativas entre los pesos secos finales del fruto entre FS en el año 18/19 (Fig. 3.1E, Cuadro S3.2). Los cultivos de girasol normalmente crecen bajo una relación FD limitante después de floración (Ruiz y Maddonni, 2006) que ocasionan un menor peso del fruto. Las menores temperaturas y niveles de radiación incidente, que normalmente ocurren en FS tardías en comparación con FS tempranas, impactan negativamente sobre este componente del rendimiento debido a posibles limitaciones en la acumulación y

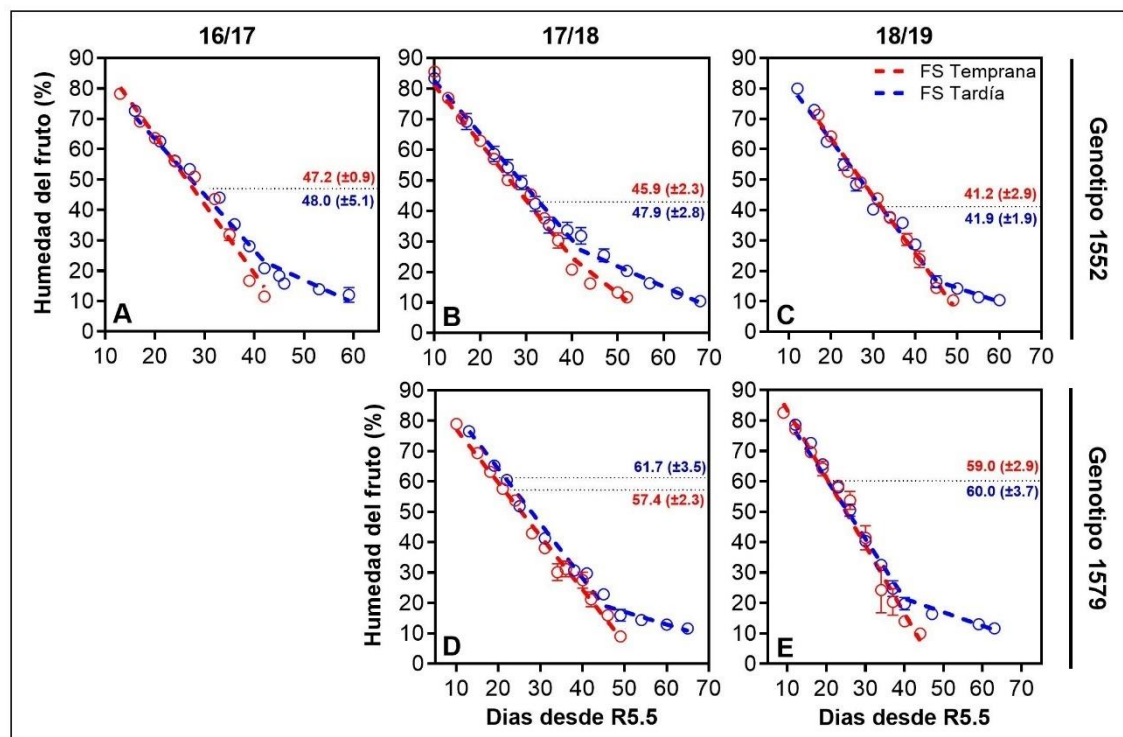
translocación de biomasa (Bange et al., 1998). Esto puede ejemplificarse claramente para el genotipo 1552 en el año 16/17 (Fig. 3.1A). Sin embargo, una mayor cantidad de radiación incidente (Angeloni et al., 2021) e interceptada por planta durante los primeros 15 días después de finalizada la antesis tiene un efecto positivo sobre el peso del fruto (Dosio et al., 2000, Aguirrezábal et al., 2003). Además, el aumento en el peso del fruto frente a la mejora en el nivel de radiación post-antesis depende del genotipo, ya que algunos son más sensibles a los cambios en el ambiente (de la Vega y Hall 2002b). El alto nivel de radiación incidente post-antesis en las FS tardías (Cuadro S3.1) que experimentaron las plantas en el año 17/18 en ambos genotipos podría explicar los mayores pesos del fruto observados en estas FS (Fig. 3.1B, Fig. 3.1D). Estos cambios fueron más evidentes en el genotipo 1579 (Fig. 3.1). En el resto de casos (Fig. 3.1C, Fig.



**Fig. 3. 1.** Evolución del peso seco unitario del fruto (mg) en función de los días desde antesis (R5.5) para el genotipo 1552 evaluado en las campañas 16/17 (A), 17/18 (B) y 18/19 (C) y para el genotipo 1579 evaluado en 17/18 (D) y 18/19 (E). Las líneas rojas representan las FS tempranas y las azules, las FS tardías. Los puntos indican el promedio de peso seco ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las cosechas de las FS tempranas y tardías ocurrieron, según genotipos y años: 13 de enero y 3 de mayo para 1552 en 16/17; 7 de febrero y 6 de mayo para 1552 en 17/18; 26 de enero y 17 de mayo para 1552 en 18/19; 21 de febrero y 8 de mayo para 1579 en 17/18; y 7 de febrero y 17 de mayo para 1579 en 18/19.

3.1E), la similitud en el peso entre FS podría deberse a una compensación parcial del peso del fruto por el menor número (Cantagallo y Hall, 2002; Cantagallo et al., 2004).

Las tasas de secado del fruto de las FS tempranas fueron mayores a las obtenidas en las FS tardías (Fig. 3.2, Cuadro S3.3). En las FS de enero se observó una disminución de la velocidad de secado hacia el final de llenado (modelo bilineal) determinada por un aumento de la humedad relativa asociada a menores temperaturas y niveles de radiación incidente (MF–MC; Fig. 3.2, Cuadro S3.1). El genotipo 1552 presentó una menor humedad del fruto en MF, en ambas FS, en comparación con los observado en el genotipo 1579 (Fig. 3.2). Estos menores valores de humedad en MF en el genotipo 1579 estuvieron asociados a una menor duración del período de llenado de los frutos y un menor peso de los mismos que el genotipo 1552 (Fig. 3.1, Cuadro S3.2).

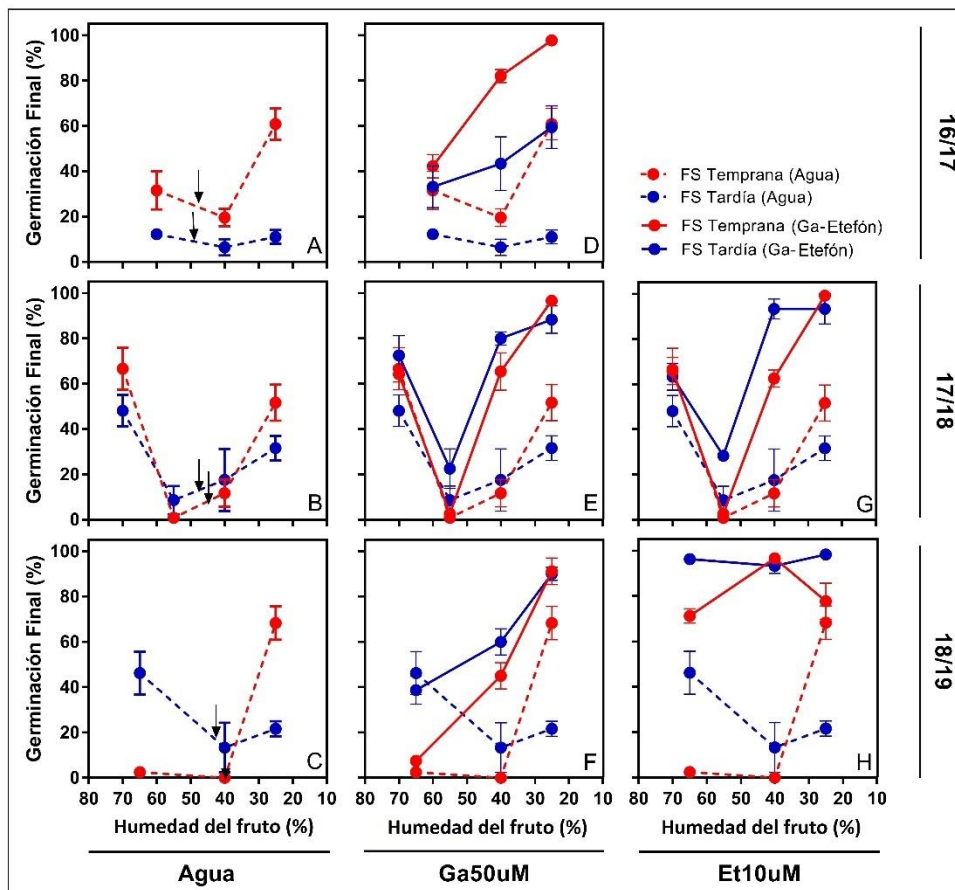


**Fig. 3. 4.** Evolución de la humedad del fruto (%) en función de los días desde antesis (R5.5) para el genotipo 1552 evaluado en las campañas 16/17 (A), 17/18 (B) y 18/19 (C) y para el genotipo 1579 evaluado en 17/18 (D) y 18/19 (E). Las líneas rojas representan las FS tempranas y las azules las FS tardías. Los puntos indican el promedio del porcentaje de humedad ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Se ajustó un modelo lineal a los datos de humedad de las FS tempranas (excepto en B) y un modelo bilineal a las FS tardías. Las tasas de secado de ambas FS se encuentran en el Cuadro S3.3. Para cada caso, se resalta el contenido de humedad promedio ( $\pm$ EE,  $n=3$ ) de los frutos al momento de MF.

### 3.3.3. Germinación de embriones en desarrollo.

#### 3.3.3.1. Agua, GAs y etefón.

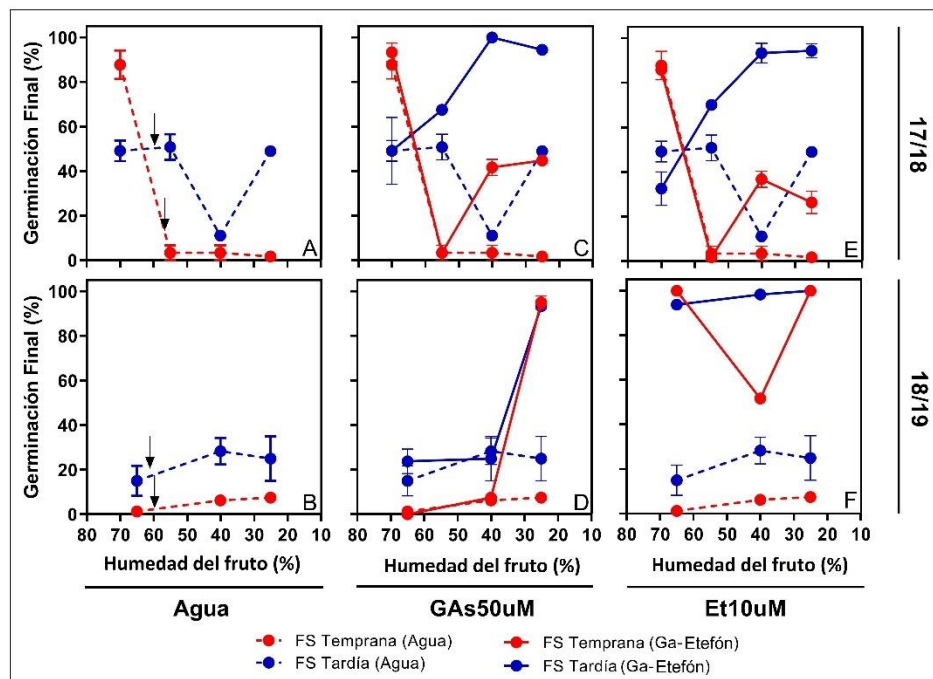
En el genotipo 1552 se observó una disminución en el porcentaje de germinación de los embriones en agua a medida que los frutos fueron perdiendo humedad hasta aproximadamente MF, mientras que con posterioridad a este momento (a partir del 40% de humedad), se observó un aumento de la germinación de los embriones (Fig. 3.3A, Fig. 3.3B, Fig. 3.3C). Este aumento fue superior para los embriones de las FS tempranas. El incremento de la capacidad germinativa observada a partir de 40% de humedad estuvo asociado a un aumento en la sensibilidad de los embriones al agregado exógeno de GAs



**Fig. 3. 7.** Porcentaje final de germinación de embriones en desarrollo del genotipo 1552, incubados a 25°C, según el medio de incubación (agua, GAs 50µM o etefón 10µM) y año evaluado. FS tempranas se indican en rojo, y las FS tardías, en azul. Cuando la incubación se realizó en agua, las líneas son punteadas y si en el medio de incubación se incluyó GAs o etefón, las líneas son llenas. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las líneas negras indican el momento de MF.

y etefón, sin observarse diferencias claras entre FS (Fig. 3.3D, Fig. 3.3E, Fig. 3.3F, Fig. 3.3G, Fig. 3.3H). Estos resultados evidencian una disminución del nivel de dormición de los embriones durante el desarrollo a partir de 40% de humedad. Sólo en el año 18/19 se observó una promoción de la germinación por el agregado de etefón en embriones con un mayor porcentaje de humedad del fruto (Fig. 3.3H).

Contrariamente a lo ocurrido en el 1552, en el genotipo 1579 el momento de MF no estableció el punto a partir del cual los embriones aumentaron su capacidad de germinar (Fig. 3.4A, Fig. 3.4B). Por el contrario, en el año 17/18 se observó que después de haber llegado al máximo peso seco de los frutos (aproximadamente cuando los frutos presentaron 60% de humedad), los embriones continuaron con una disminución en su porcentaje de germinación. En relación al efecto de la FS, exceptuando el punto de 70%, los embriones de FS tardías presentaron mayor germinación que los de FS tempranas. Asimismo, la respuesta de los embriones incubados en GAs y etefón es más clara luego

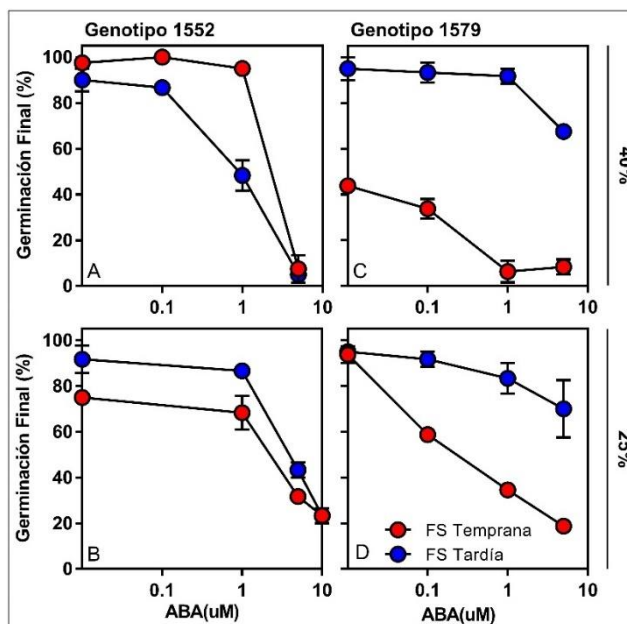


**Fig. 3. 10.** Porcentaje final de germinación de embriones en desarrollo del genotipo 1579, incubados a 25°C, según el medio de incubación (agua, GAs 50µM o etefón 10µM) y año evaluado. FS tempranas se indican en rojo, y las FS tardías, en azul. Cuando la incubación se realizó en agua, las líneas son punteadas y si en el medio de incubación se incluyó GAs o etefón, las líneas son llenas. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las líneas negras indican el momento de MF.

de alcanzarse un 40% de humedad (Fig. 3.4C, Fig. 3.4D, Fig. 3.4E, Fig. 3.4F). Sin embargo, en este caso, en el año 17/18, la respuesta fue mayor para los embriones provenientes de la FS tardía. Para el año 18/19, la respuesta al agregado de GAs y etefón fue similar entre FS. A su vez, como fue observado en el genotipo 1552 durante el año 18/19, el agregado de etefón promovió la germinación de los embriones provenientes de frutos más inmaduros (es decir, de mayor humedad; Fig. 3.4F). El atraso en la FS no produjo cambios significativos en la sensibilidad de los embriones en desarrollo a agregados crecientes de GAs y etefón (Fig. S3.2, Fig. S3.3), en ninguno de los genotipos evaluados.

### 3.3.3.2. Sensibilidad al ABA de embriones en desarrollo.

La FS afectó la germinación de embriones inmaduros incubados en soluciones de ABA (Fig. 3.5). En el muestreo de 40% de humedad de los frutos, los embriones del



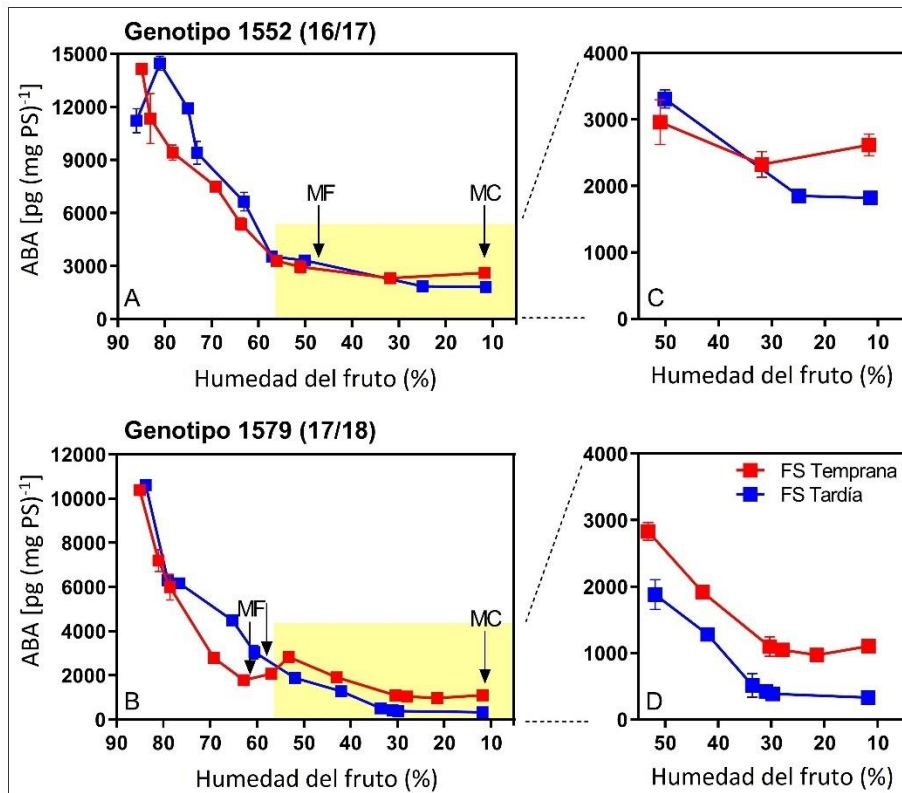
**Fig. 3. 13.** Porcentaje final de germinación de embriones, incubados a 25°C, en función de la concentración de ABA, según FS y genotipo (1552, A y B; 1579, C y D), provenientes de frutos en desarrollo con un 40% y 25% de humedad. Los puntos rojos representan a las FS tempranas, y los azules a las FS tardías. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como  $x=0$  están graficados como  $x=0.01$ , y representan a embriones incubados en F100.

genotipo 1552 de la FS temprana mostraron menor sensibilidad al ABA que los provenientes de FS tardías (Fig. 3.5A), mientras que a 25% de humedad del fruto (Fig. 3.5B) no se observaron diferencias en sensibilidad entre ambas FS. Para el genotipo 1579, en cambio, los embriones de la FS tardía presentaron, en ambos muestreos, una menor sensibilidad al ABA que los de FS tempranas (Fig. 3.5C, Fig. 3.5D).

#### 3.3.4. Contenido endógeno de ABA.

##### 3.3.4.1. Durante el desarrollo del fruto en la planta madre.

A medida que transcurrió el desarrollo de los frutos en la planta madre se observó una disminución del contenido de ABA en los embriones (Fig. 3.6A) y ejes embrionarios (Fig. 3.6B) para ambas FS. Hasta aproximadamente un 60–55% de humedad del fruto, el nivel de ABA fue mayor en la FS tardía en ambos genotipos. Sin embargo, hacia el final del desarrollo (Fig. 3.6C, Fig. 3.6D) (<55–45% de humedad del fruto), los embriones y ejes embrionarios de las FS tempranas presentaron un mayor contenido endógeno de ABA que los embriones de las FS tardías en ambos genotipos. Estas diferencias en el nivel endógeno de ABA entre FS fueron mayores en el genotipo 1579 que en el 1552. El genotipo 1552 presentó un mayor nivel endógeno de ABA que el 1579, sin embargo, esta comparación puede resultar espuria, ya que en el 1579 las mediciones se realizaron sobre el eje embrionario, mientras que, en el 1552 sobre el embrión entero, quedando enmascarada una posible diferencia por el aporte de los cotiledones en este último genotipo. La misma tendencia de contenido endógeno de ABA y las diferencias entre FS se presentan en la Fig. S3.4 para la campaña 18/19.



**Fig. 3. 16.** A y B. Contenido endógeno de ABA ( $\mu\text{g ABA mg PS}^{-1}$ ) en función del porcentaje de humedad de frutos en embriones enteros (genotipo 1552) y ejes embrionarios (genotipo 1579) extraídos de frutos provenientes de FS tempranas (líneas rojas) y FS tardías (líneas azules). C y D. Contenido endógeno de ABA hacia el final del desarrollo, para ambos genotipos. Los puntos indican la media del contenido endógeno de ABA y de germinación de embriones ( $\pm\text{EE}$ ,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las flechas en los paneles A y B indican la MF y la MC en ambos genotipos. En el caso del 1552, los valores de humedad a MF son similares (47.2 y 48.0 para la FS Temprana y Tardía, respectivamente). La cosecha ocurrió en ambos genotipos y FS con una humedad de los frutos cercana a 11%.

### 3.3.4.2. Durante la incubación de frutos en desarrollo.

El contenido de ABA en embriones o ejes embrionarios en desarrollo incubados en agua y F100 difirió entre FS (Cuadro 3.2). En el año 16/17, el contenido de ABA inicial de los embriones no difirió entre FS, mientras que en el año 17/18 los ejes embrionarios de las FS tardías presentaron un contenido de ABA menor que las FS tempranas. A su vez, en este último año, se obtuvieron menores valores de contenido de ABA, probablemente debido a que en esta segunda campaña la determinación se realizó en los ejes embrionarios y en un estado más avanzado del desarrollo. En general el contenido de ABA de los embriones disminuyó (16/17) o se mantuvo constante (17/18) luego de 24

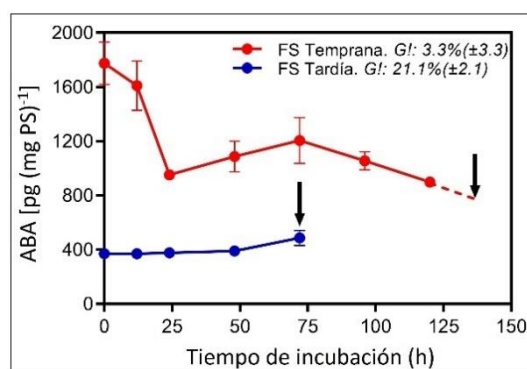


horas de incubación en agua mientras que, en todos los casos, se observó una significativa disminución cuando se inhibió la síntesis de ABA mediante el agregado de F100. La capacidad de síntesis de ABA de los embriones y ejes embrionarios determinada como la diferencia en contenido de ABA a las 24 horas entre agua y F100 fue mayor en las FS tempranas que en las tardías en los dos años evaluados. Cuando una porción de los frutos utilizados para estimar la capacidad de síntesis de ABA fue incubado a 25°C, no se observó germinación en ningún medio de incubación (datos no presentados). Sin embargo, en concordancia con la mayor capacidad de síntesis de ABA determinada, los embriones de las FS tempranas incubados en F100 aumentaron considerablemente su germinación en comparación a lo observado en agua destilada, mientras que no se observó un efecto significativo de promoción de la germinación por F100 en los embriones de FS tardías (Cuadro 3.2).

**Cuadro 3. 2.** Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en embriones (16/17) y ejes embrionarios (17/18) del genotipo 1552 extraídos de frutos en desarrollo (55% y 45% de humedad para 16/17 y 17/18, respectivamente) provenientes de FS tempranas y FS tardías, incubados en agua destilada y F100 a 25°C. El contenido de ABA se midió en dos momentos: al comienzo y a las 24 horas de incubación. En este último momento se estimó la síntesis de ABA *de novo*. Se presentan datos medios de contenido de ABA ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa de los contenidos de ABA entre FS, tiempos de incubación y solución, con letras diferentes, cuando la interacción entre estos tres factores fue significativa (16/17: p-valor=0.045; 17/8: p-valor=0.011). El análisis se realizó por año. En todos los casos se indica la media ( $\pm$ EE, n=3) de germinación final (G!) de embriones, luego de 15 días de incubación, junto con la diferencia significativa (16/17: p-valor=0.020; 17/18: p-valor=0.018).

	16/17		17/18	
	FS Temprana	FS Tardía	FS Temprana	FS Tardía
<i>Comienzo incubación</i>	3574.0 ( $\pm$ 122.8) <sup>a</sup>	3504.7 ( $\pm$ 11.0) <sup>a</sup>	1089.3 ( $\pm$ 20.4) <sup>a</sup>	770.0 ( $\pm$ 17.4) <sup>b</sup>
<i>24 horas</i>				
Sin F100	3382.7 ( $\pm$ 112.8) <sup>a</sup>	2862.1 ( $\pm$ 33.1) <sup>b</sup>	1107.9 ( $\pm$ 30.57) <sup>a</sup>	901.9 ( $\pm$ 45.8) <sup>b</sup>
Con F100	2973.1 ( $\pm$ 99.6) <sup>b</sup>	2675.0 ( $\pm$ 20.3) <sup>c</sup>	766.7 ( $\pm$ 19.4) <sup>b</sup>	720.3 ( $\pm$ 58.6) <sup>c</sup>
<b>Síntesis de ABA <i>de novo</i> estimada</b>	<b>409.6</b>	<b>187.1</b>	<b>341.2</b>	<b>181.6</b>
G! Sin F100 (%)	28.3 ( $\pm$ 1.7) <sup>ab</sup>	11.0 ( $\pm$ 2.1) <sup>b</sup>	8.5 ( $\pm$ 0.8) <sup>b</sup>	16.7 ( $\pm$ 1.7) <sup>ab</sup>
G! Con F100 (%)	99.0 ( $\pm$ 0.5) <sup>a</sup>	22.0 ( $\pm$ 4.2) <sup>ab</sup>	53.3 ( $\pm$ 4.6) <sup>a</sup>	22.0 ( $\pm$ 1.7) <sup>ab</sup>

En el genotipo 1579 no se observaron diferencias en la capacidad de síntesis de ABA *de novo* de los ejes embrionarios como resultante de variaciones en la FS (datos no presentados). Sin embargo, los ejes embrionarios de las FS tempranas presentaron un mayor nivel de ABA durante la incubación que los ejes de FS tardías (Fig. 3.7). Además, los embriones de las FS tardías presentaron un mayor porcentaje de germinación que los de las FS tempranas (ver inset Fig. 3.7), sugiriendo que la mayor germinación los embriones de las FS de enero podría explicarse por un menor nivel de ABA endógeno durante la incubación. Por su parte, los frutos de ambas FS no germinaron (datos no presentados).

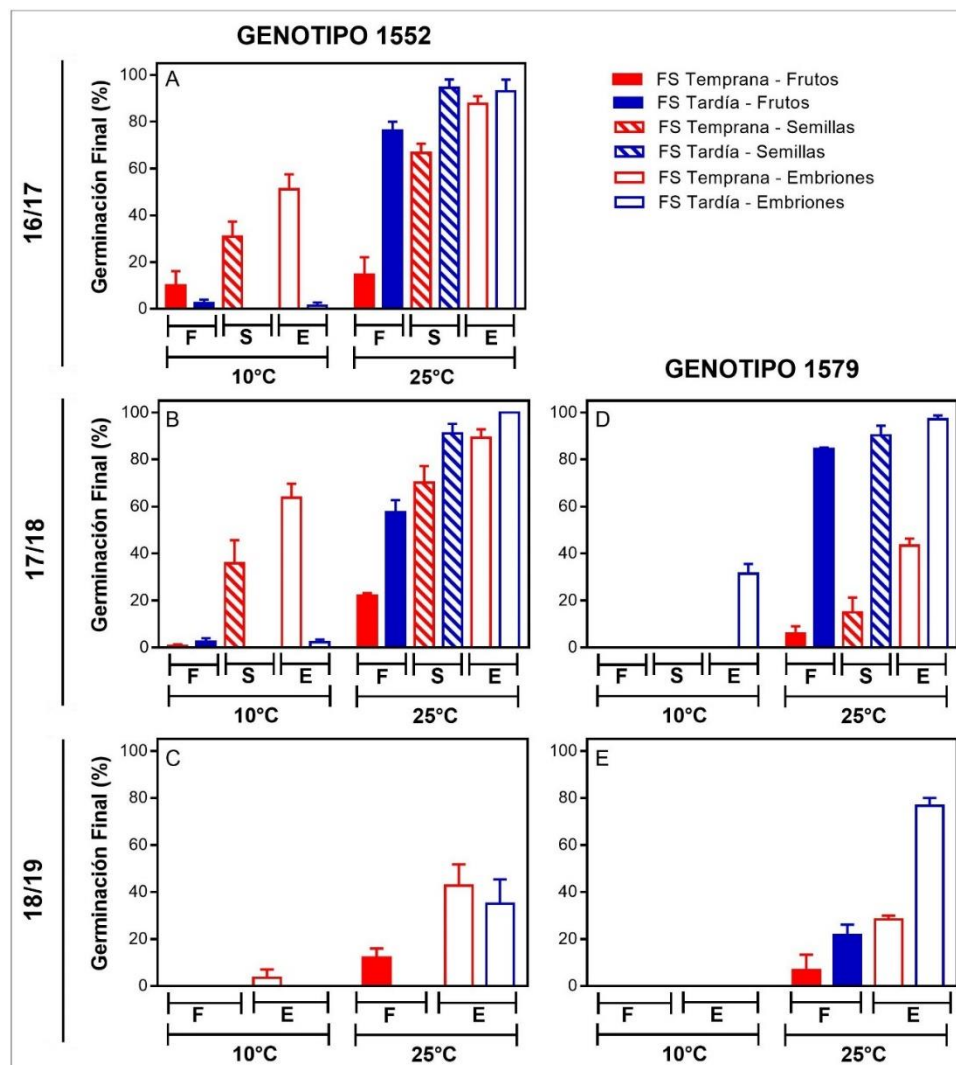


**Fig. 3. 19.** Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en función de las horas de incubación en ejes embrionarios del **genotipo 1579** (17/18) extraídos de frutos en desarrollo (35% de humedad) provenientes de FS tempranas (puntos y líneas rojas) y tardías (puntos y líneas azules), incubados en agua destilada. Se presentan datos medios de contenido de ABA ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las flechas negras indican el comienzo de la germinación de embriones para cada FS. Asimismo, se indica el valor promedio de germinación (G!) de embriones ( $\pm$ EE, n=3) luego de 15 días de incubación.

### 3.3.5. Germinación de estructuras que componen el fruto a cosecha.

A cosecha las distintas estructuras del fruto mostraron diferencias en germinación en función de la FS y temperatura de incubación (Fig. 3.8). En todos los casos, se observó un aumento de la germinación a medida que se extrajeron las cubiertas del fruto; este comportamiento fue más evidente a 25°C que a 10°C. Para el genotipo 1552, los frutos (Fig. 3.8A), semillas y embriones (Fig. 3.8A, Fig. 3.8B) de las FS tempranas presentaron

un mayor porcentaje de germinación a bajas temperaturas (10°C) que los provenientes de FS tardías. Sin embargo, a 25°C se observó el comportamiento contrario: en general frutos, semillas y embriones de FS tardías mostraron un porcentaje de germinación superior al registrado en FS tempranas, más allá de las diferencias observadas entre años (en el año 18/19 se observó una menor germinación de las distintas estructuras del fruto en comparación con los años 16/17 y 17/18; Fig. 3.8C). Cuando la incubación se realizó a 25°C, las diferencias entre FS estuvieron mayormente explicadas por el efecto de las cubiertas que por variaciones en la dormición del embrión.



**Fig. 3. 22.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones a cosecha, incubados a 10 y 25°C, según FS, genotipo y año. Las barras llenas, con barras diagonales y vacías indican la germinación de frutos, semilla o embriones, respectivamente. Las barras rojas representan a las FS tempranas y las azules, a las FS tardías. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3).

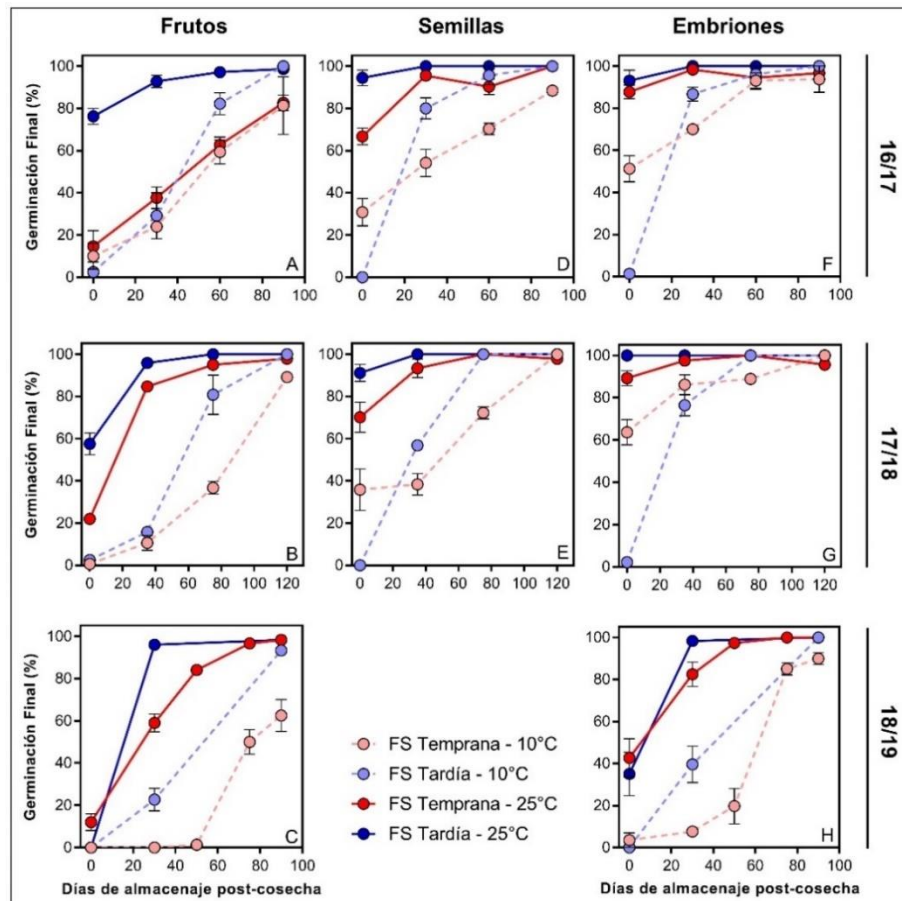
Por su parte, para genotipo 1579, la germinación de las diferentes estructuras del fruto fue nula o baja cuando se incubaron a 10°C; para el caso del año 17/18 (Fig. 3.8D) los embriones de FS tardías mostraron un porcentaje de germinación mayor al de FS tempranas. Cuando la incubación se realizó a 25°C, frutos, semillas y embriones provenientes de FS tardías presentaron un porcentaje de germinación significativamente mayor que aquellos provenientes de las FS tempranas (Fig. 3.8D, Fig. 3.8E). A diferencia de lo observado para el 1552, en este caso, las diferencias entre FS estuvieron mayormente explicadas por variaciones en el nivel de dormición embrionaria.

### 3.3.6. Germinación de estructuras que componen el fruto durante el almacenaje post-cosecha.

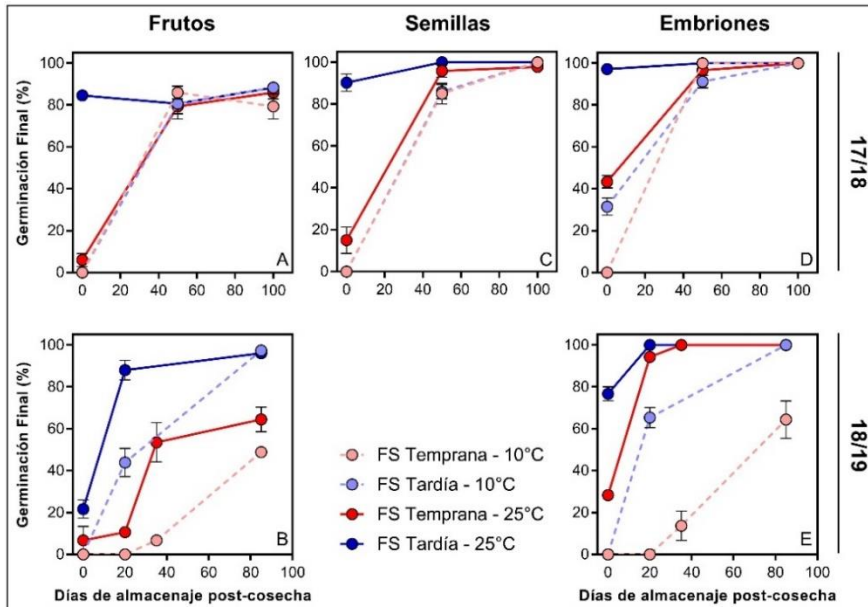
A medida que transcurrieron los días de almacenaje post-cosecha se observó un aumento paulatino de la germinación en frutos, semillas y embriones para ambas FS, temperaturas de incubación y genotipos (Fig. 3.9, Fig. 3.10). Sin embargo, los embriones y semillas siempre presentaron valores de germinación superiores o iguales a los frutos. A su vez, cuando la incubación se realizó a 10°C, se registró un menor porcentaje de germinación que a 25°C.

Variaciones en la FS provocaron diferencias en la germinación de las distintas estructuras del fruto durante el almacenaje post-cosecha. En general, frutos provenientes de FS tardías presentaron mayor germinación durante el almacenaje que los de FS tempranas, en ambas temperaturas de incubación y para ambos genotipos. Por su parte, en ambas FS, semillas y embriones perdieron rápidamente la dormición cuando se incubaron a 25°C, mientras que a bajas temperaturas se observó una mayor germinación en FS tardías, aun cuando las semillas y embriones del genotipo 1552 hayan presentado porcentajes de germinación a cosecha menores en esta FS (tardía). Se distinguieron variaciones

asociadas al año y genotipo sobre el efecto del atraso en la FS en la promoción de la germinación. Por ejemplo, durante el año 18/19 se observó un mayor nivel de dormición en ambas FS y genotipos. Por su parte, el genotipo 1579 presentó un mayor nivel de dormición en comparación al genotipo 1552, particularmente en FS tempranas.



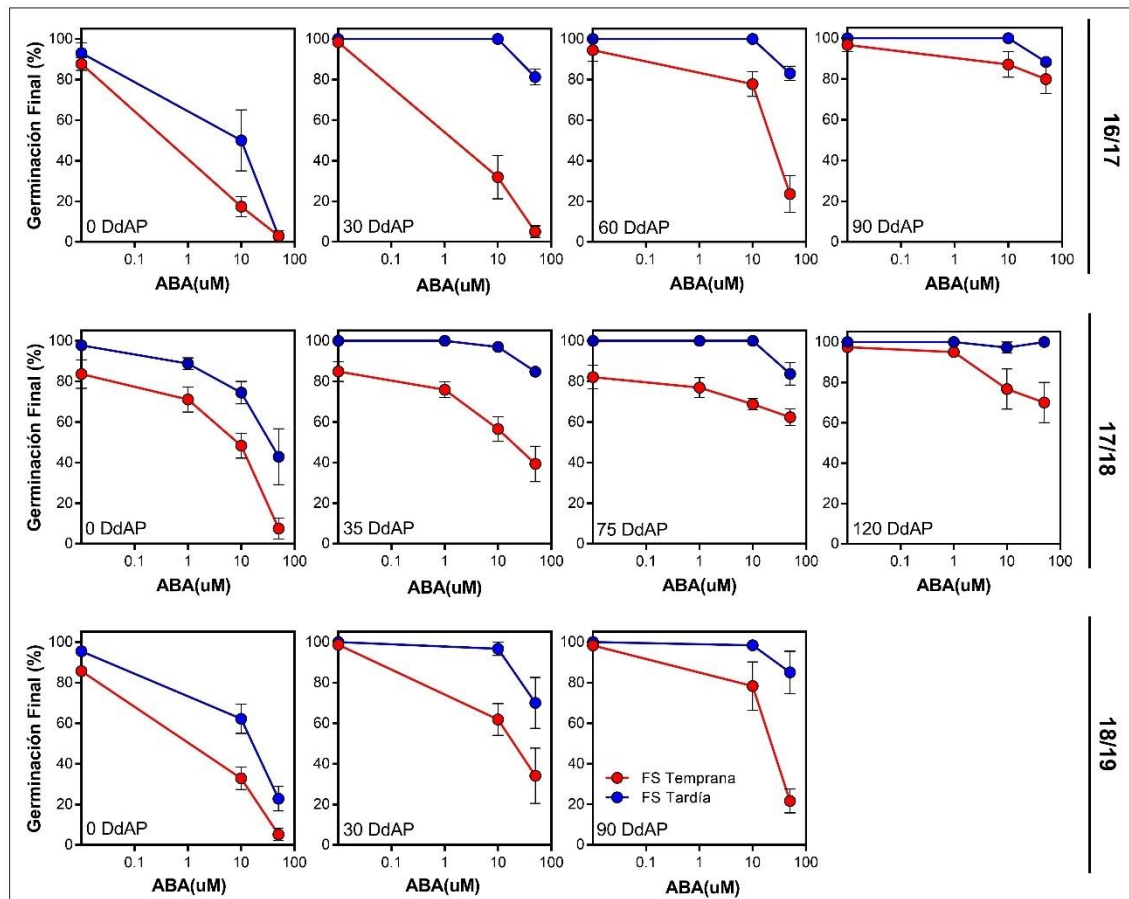
**Fig. 3. 25.** Porcentaje final de germinación de frutos (A, B y C), semillas (D y E) y embriones (F, G y H) del genotipo 1552 en función de los días desde el almacenaje post-cosecha, incubados en agua destilada, según FS y temperatura de incubación. Las líneas y puntos rojos representan a las FS tempranas y, los azules, a las FS tardías. Las líneas punteadas indican que la incubación de las estructuras del fruto se realizó a 10°C, mientras que las llenas, a una incubación de 25°C. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.



**Fig. 3. 28.** Porcentaje final de germinación de frutos (A y B), semillas (C) y embriones (D y E) del genotipo 1579 en función de los días desde el almacenaje post-cosecha, incubados en agua destilada, según FS y temperatura de incubación. Las líneas y puntos rojos representan a las FS tempranas y, los azules, a las FS tardías. Las líneas punteadas indican que la incubación de las estructuras del fruto se realizó a 10°C, mientras que las llenas, a una incubación de 25°C. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

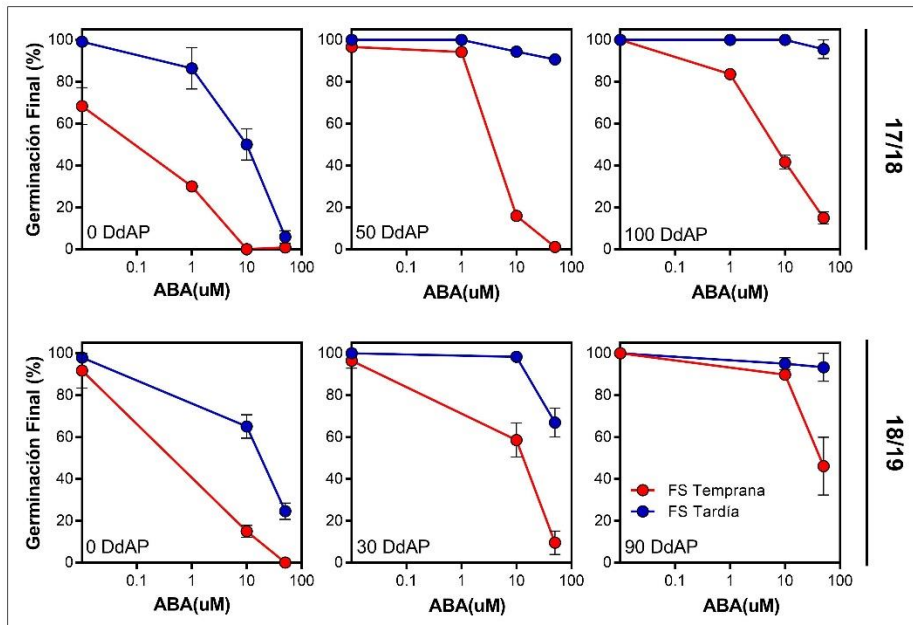
### 3.3.7. Sensibilidad de frutos y embriones al agregado exógeno de ABA, GAs y etefón a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha.

Para ambos genotipos, FS y años evaluados se observó una disminución de la sensibilidad de los embriones al efecto inhibitorio del ABA con el avance en los días de almacenaje post-cosecha (Fig. 3.11, Fig. 3.12). Sin embargo, en todos los años y temperaturas de incubación, los embriones provenientes de las FS tardías presentaron una menor sensibilidad al efecto inhibitorio del ABA que los provenientes de las FS tempranas (Fig. 3.11, Fig. 3.12, Fig. S3.7). Las diferencias entre FS en la sensibilidad al ABA de los embriones fueron mayores en el genotipo 1579. Los embriones de este genotipo, a su vez, presentaron una mayor sensibilidad al ABA que los del 1552



**Fig. 3. 31.** Porcentaje final de germinación de embriones del genotipo 1552 incubados a 25°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdAP), según FS y año. Los puntos rojos representan a las FS tempranas y los azules, a las FS tardías. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como  $x=0$  están graficados como  $x=0.01$ , y representan a embriones incubados en F100.

No se observaron diferencias atribuibles a la FS en la sensibilidad de los frutos a las GAs ni al etefón a cosecha (Fig. S3.5). En ambas FS se distingue una promoción de la germinación a medida que la dosis de estos promotores aumenta. Asimismo, las curvas de las FS tardías están, en todos los casos, por encima de las FS tempranas. Sin embargo, en algunos casos la respuesta no se puede evaluar correctamente ya que la germinación en agua es alta, sobre todo en las FS tardías.



**Fig. 3.34.** Porcentaje final de germinación de embriones del genotipo 1579 incubados a 25°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdAP), según FS y año. Los puntos rojos representan a las FS tempranas y los azules, a las FS tardías. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como  $x=0$  están graficados como  $x=0.01$ , y representan a embriones incubados en F100.

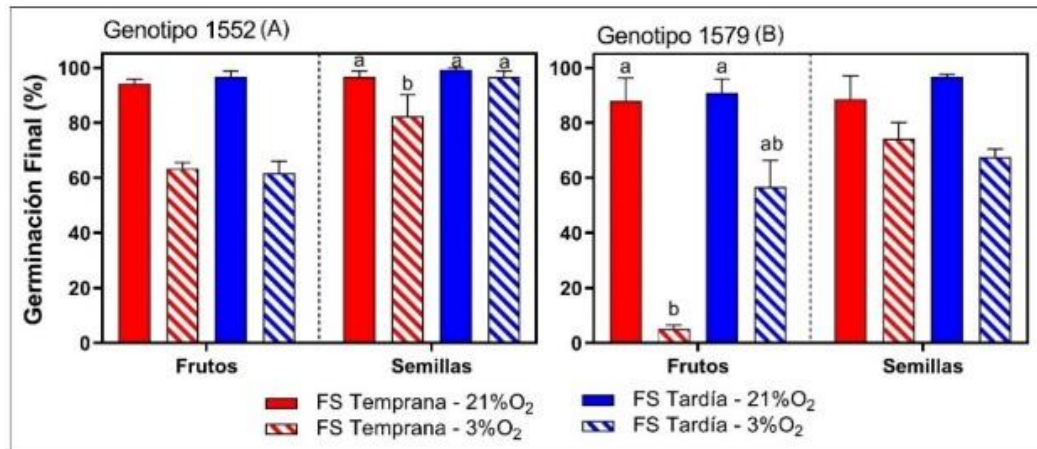
### 3.3.8. Sensibilidad a la hipoxia y efectos sobre la sensibilidad al ABA.

La incubación de frutos y semillas en una atmósfera limitante de  $O_2$  redujo el porcentaje de germinación en ambos genotipos y FS (Fig. 3.13). Sin embargo, las semillas del genotipo 1552 y los frutos del genotipo 1579 provenientes de la FS tardía presentaron una menor disminución de la germinación cuando se incubaron a 3%  $O_2$ , en comparación con los provenientes de FS tempranas.

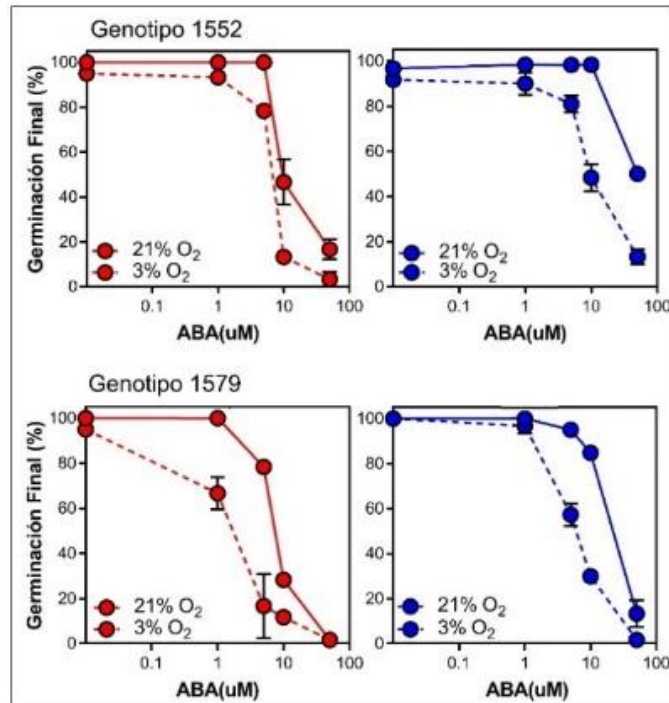
A su vez, la condición de hipoxia (3%  $O_2$ ) aumentó la sensibilidad al ABA de los embriones en ambos genotipos y FS (Fig. 3.14). Sin embargo, en el genotipo 1579 el aumento en la sensibilidad al ABA como resultado de la condición de hipoxia fue mayor en embriones provenientes de FS tempranas que en los provenientes de FS tardías. Por ejemplo, en ABA 1  $\mu$ M se registró una disminución en la germinación de casi un 40% para embriones de la FS temprana, mientras que la disminución fue prácticamente nula



en la FS tardías. Una diferencia similar se observó en ABA 5  $\mu$ M. En el genotipo 1552, no se pudo observar un efecto claro de la FS sobre la modificación de la sensibilidad al



**Fig. 3. 40.** Porcentaje final de germinación de frutos y semillas del genotipo 1552 y 1579 incubados a 25°C en agua destilada bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21% O<sub>2</sub> y 3% O<sub>2</sub>. Las barras rojas representan a las FS tempranas y las azules, a las FS tardías. Las barras llenas indican que la incubación se realizó en una atmósfera de 21%, mientras que las barras con líneas horizontales, a una incubación de 3% O<sub>2</sub>. Para ambos genotipos, el ensayo se realizó a los 120 días de almacenaje post-cosecha, durante la campaña 17/18. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por estructura evaluada) según FS y concentración de O<sub>2</sub>, según la significancia del test de Kruskal-Wallis (1552 frutos: p-valor=0.204; 1552 semillas: p-valor=0.032; 1579 frutos: p-valor=0.006; 1579 semillas: p-valor=0.059).



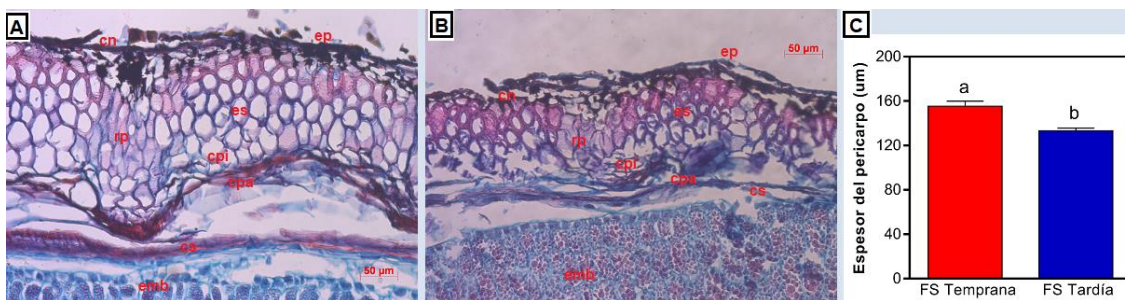
**Fig. 3. 37.** Porcentaje final de germinación de embriones de 40 días de almacenaje post-cosecha incubados a 25°C en condiciones crecientes de ABA, bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21% O<sub>2</sub> (líneas llenas) y 3% O<sub>2</sub> (líneas punteadas), según FS (rojo: tempranas; azul: tardías). Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en agua destilada.

ABA debido a la hipoxia, ya que los embriones de la FS temprana a 21%O<sub>2</sub> presentaron una significativa disminución de la germinación a 10 $\mu$ M de ABA. Además, este genotipo fue menos sensible al efecto inhibitorio del ABA que el genotipo 1579 en ambas FS.

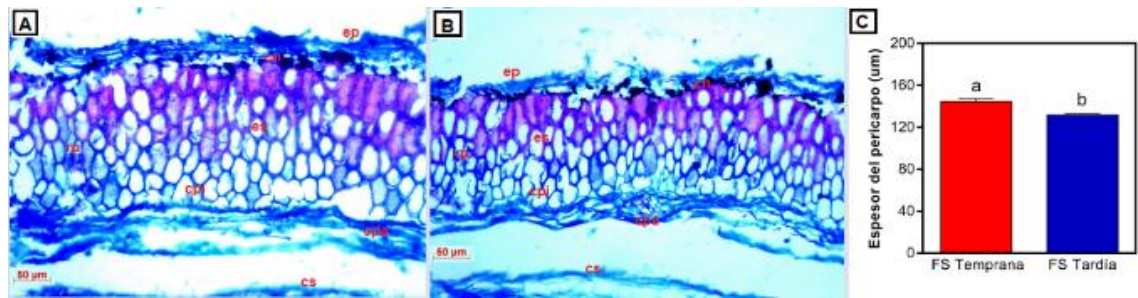
### 3.3.9. Características anatómicas del pericarpo y potencial de crecimiento del embrión.

El espesor del pericarpo proveniente de las FS tempranas fue, para ambos genotipos, significativamente mayor que los provenientes de FS tardías (Fig. 3.15). Este mayor espesor se puede explicar por un mayor número y tamaño de las células del sector del esclerénquima y de la capa de parénquima interna del pericarpo. La disminución del potencial osmótico (-1.5 MPa) del medio de incubación redujo la germinación final de embriones provenientes de FS tempranas (Fig. 3.16) en ambos genotipos en relación con los valores observados en agua. Por el contrario, los embriones de FS tardías no evidenciaron una disminución del porcentaje de germinación en comparación con el observado en agua, aunque se observó un aumento del tiempo requerido para alcanzar el porcentaje de germinación máximo.

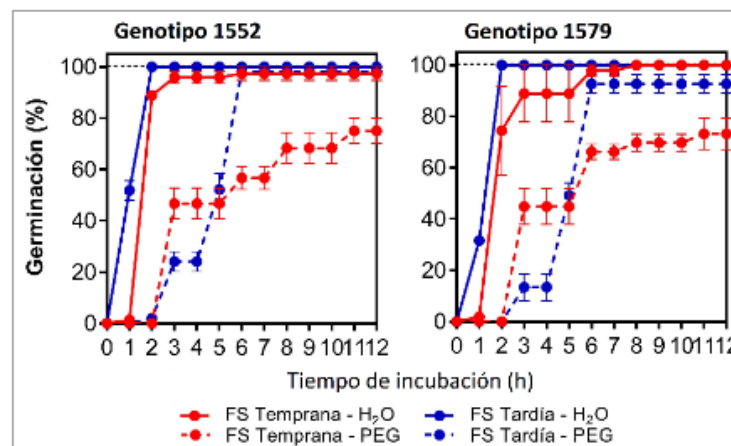
#### **GENOTIPO 1552**



## GENOTIPO 1579



**Fig. 3. 43.** Corte histológico del pericarpio del tercio medio del capítulo de los genotipos de girasol 1552 y 1579 provenientes de FS temprana (A) y tardía (B), del año 18/19. Las referencias de las imágenes indican: ep: epidermis, cn: capa negra, es: esclerénquima, rp: radio parenquimático, cpi: capa de parénquima interna, cpa: capa de parénquima aplastada, cs: cubierta seminal (endosperma), emb: embrión. Escala = 50µm. (C) Espesor del pericarpio (um) de FS tempranas (barras rojas) y tardías (azules) para ambos genotipos. Las barras indican el promedio de espesor del pericarpio ( $\pm$ EE, n=3).



**Fig. 3. 46.** Porcentaje de germinación de embriones, provenientes de frutos a los 40 días de almacenaje post-cosecha, en función de los días de incubación según FS (Temprana en rojo y Tardía en azul), para el año 18/19. Las líneas llenas indican que la incubación se llevó a cabo en agua destilada, mientras que las líneas punteadas, a una incubación en PEG6000 que genera un potencial osmótico de -1.5MPa. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### 3.4. Discusión

Como fue observado en el capítulo 2, el atraso en la FS determinó una disminución del nivel de dormición en ambos genotipos en las tres campañas evaluadas (Fig. 3.8, Fig. 3.9, Fig. 3.10). Dichas diferencias se establecieron temprano durante el desarrollo (Fig. 3.3, Fig. 3.4). En general, los embriones presentaron una disminución en la germinación hasta un punto a partir del cual la capacidad germinativa comenzó a aumentar (Fig. 3.3,

Fig. 3.4). En ambos genotipos y FS, este momento coincidió con una humedad del fruto de aproximadamente 40%. A partir de este momento, se observó un aumento en la germinación de los embriones de ambos genotipos y FS, así como un aumento en la respuesta a las GAs y etileno (Fig. 3.3, Fig. 3.4). Variaciones similares en la capacidad germinativa de los embriones durante el desarrollo fueron observadas en diversas especies (Sidhu y Cavers, 1977; Le Page-Degivry et al., 1990; Xu et al., 1990; Hilhorst, 1995). El porcentaje de humedad de los frutos al momento en el que los embriones comienzan a perder la dormición coincide con el valor de humedad a MF reportado para híbridos de girasol en condiciones de producción (aproximadamente 38-40%; Satorre et al., 2003). Sin embargo, en esta tesis, la MF de los genotipos evaluados ocurrió con humedades del fruto mayores (Fig. 3.2). En varios cultivos se ha sugerido que la “calidad germinativa” de las semillas aumenta hasta alcanzar un máximo en MF. Probablemente el valor de humedad a partir del cual los embriones comenzaron a salir de la dormición en este trabajo está relacionado con que los mismos hayan alcanzado su máxima “calidad germinativa”. Trabajos realizados por Bailly et al. (2003) sugieren que la adquisición de vigor en las semillas de girasol estaría asociado a un aumento en la actividad de la catalasa, cuya actividad está relacionada al nivel de humedad del embrión, y que tendría su máxima actividad entre 40% y 30% de humedad del fruto.

Sin embargo, esta disminución del nivel de dormición de los embriones (es decir, el aumento en la germinación) hacia el final de la etapa de desarrollo difirió entre genotipos y FS. Mientras que en el 1552 los embriones de la FS temprana presentaron mayor germinación en agua que los de la FS tardía (Fig. 3.3A, Fig. 3.3B, Fig. 3.3C), en el 1579 se observó la respuesta contraria (Fig. 3.4A, Fig. 3.4B). En el caso del 1552 este mayor porcentaje de germinación para la FS temprana se asoció con un mayor contenido endógeno de ABA hacia el final del desarrollo (Fig. 3.6) y a una mayor capacidad de

síntesis de ABA *de novo* por parte de los embriones (55 y 45% para los años 16/17 y 17/18, respectivamente; Cuadro 3.2). En forma contraria en el genotipo 1579, el mayor porcentaje de germinación observado en los embriones de FS tardías mostró una asociación con un menor nivel de ABA en los ejes embrionarios (Fig. 3.6, Fig. 3.7). Estos resultados contribuyen a la idea de que no existiría una relación directa entre el metabolismo del ABA y la germinación de los embriones en agua durante el desarrollo, como se observó para el genotipo 1552, tal como reportaron varios autores en diversas especies (Walker-Simmons, 1988; Xu et al., 1990; Xu y Bewley, 1991; Steinbach et al., 1995; Kermodé, 2005; Barrero et al., 2012). Sin embargo, estas variaciones en el metabolismo de ABA durante el desarrollo se asociaron a los efectos de la FS sobre el nivel de dormición de los frutos durante la cosecha y la post-cosecha en ambos genotipos. En este sentido, frutos de FS tempranas, que presentaron embriones con un mayor contenido endógeno de ABA a cosecha y una mayor capacidad de síntesis de ABA, presentaron un mayor nivel de dormición (Cuadro 3.2, Fig. 3.6, Fig. 3.7, Fig. 3.8). Esta variación en el nivel de dormición de los frutos estuvo asociada a diferencias en la sensibilidad al ABA de los embriones. Los frutos provenientes de FS tempranas presentaron un mayor nivel de dormición que los de FS tardías, asociado a embriones más sensibles al ABA, tanto en desarrollo como a cosecha y durante la post-cosecha, en diferentes temperaturas de incubación (Fig. 3.5, Fig. 3.11, Fig. 3.12, Fig. S3.7). Estos resultados sugieren que la mayor capacidad de síntesis de ABA (genotipo 1552; Cuadro 3.2) o el mayor contenido de ABA en la incubación (genotipo 1579, Fig. 3.7) observados durante el desarrollo de los embriones de FS tempranas podrían determinar la mayor sensibilidad de los embriones al ABA en estas FS (Fig. 3.5). Esta sensibilidad persistiría durante varios meses luego de la cosecha, y sería el mecanismo responsable de mantener el nivel de dormición del fruto entero durante la post-cosecha (Fig. 3.9, Fig. 3.10, Fig.

3.11, Fig. 3.12). Existen evidencias en la literatura que apoyarían esta hipótesis. Por ejemplo, Steinbach et al. (1997) observaron que la aplicación de fluridone en el desarrollo temprano de frutos de sorgo granífero provocó una disminución en el contenido de ABA de los embriones durante el desarrollo, determinando una menor dormición de los frutos que se asoció a una menor sensibilidad al ABA de los embriones. Por su parte, la expresión de *LsABI5* (gen de la ruta de señalización del ABA) se suprimió en un mutante de lechuga que presentaba el gen *LsNCED4* (gen de síntesis de ABA) silenciado (López-Molina et al., 2002; Huo y Bradford, 2015). En tomate, semillas de un mutante deficiente en ABA germinaron rápidamente en agua y se necesitaron mayores concentraciones de ABA para inhibir la germinación de este genotipo en comparación con las semillas del tipo salvaje (Ni y Bradford, 1993). En relación al girasol, Le Page-Degivry y Garello (1992) observaron que la disminución del contenido de ABA de los embriones durante el desarrollo mediante la aplicación de fluridone redujo la sensibilidad de los mismos al ABA.

El aumento en la sensibilidad de los embriones a las GAs y al etileno, en ambos genotipos hacia etapas finales del desarrollo (Fig. 3.3, Fig. 3.4, Fig. S3.2, Fig. S3.3, Fig. S3.5) refleja el aumento en la capacidad de germinar de los embriones en ambas FS (Hilhorst et al., 1986; Karssen et al., 1989; Hilhorst, 1995; Benech-Arnold et al., 2003). Esto se puede relacionar con la menor capacidad de síntesis de ABA en estos momentos (Le Page-Degivry et al., 1996). Sin embargo, tal como reportó Pizzorno (2021) en experimentos donde se restringió la radiación incidente sobre la planta madre durante el llenado del fruto, no se observaron diferencias atribuibles a la FS en la respuesta a estas hormonas (Fig. 3.3, Fig. 3.4, Fig. S3.2, Fig. S3.3, Fig. S3.4). En este sentido, frutos y embriones provenientes de FS contrastantes en distintos estadios del desarrollo no presentaron respuesta al agregado de inhibidores de síntesis de GAs al medio de

incubación, sugiriendo que no tendría lugar la síntesis *de novo* de GAs durante la incubación (Fig. S3.6). Más allá de estos resultados, no se puede descartar la posibilidad de que las diferencias observadas en el nivel de dormición del fruto puedan estar relacionadas a variaciones en el metabolismo de las GAs durante la etapa de desarrollo y maduración de los frutos. En el presente trabajo no se evaluaron los cambios en el contenido endógeno de GAs durante esta etapa en los genotipos estudiados. Sin embargo, resultados obtenidos en ensayos de FS realizados con otros genotipos (B91 y B123, con niveles de dormición contrastantes; Andrade et al., 2015; Roselló et al., 2016; Vigliocco et al., 2017) sugieren que, más allá de los cambios en el contenido endógeno de ABA, el menor nivel de dormición de los frutos en FS tardías también estaría asociado a un aumento en el contenido endógeno de GA4 (Fig. S3.8, Fig. S3.9).

Durante el almacenaje post-cosecha en todos los casos evaluados (dos genotipos, tres años y varios momentos del almacenaje), los embriones de FS tempranas presentaron mayor sensibilidad al agregado exógeno del ABA que los provenientes de FS tardías, en concordancia con el mayor nivel de dormición del fruto entero en FS tempranas (Fig. 3.9A, Fig. 3.9B, Fig. 3.9C, Fig. 3.10A, Fig. 3.10B, Fig. 3.11, Fig. 3.12, Fig. S3.5). Estos resultados sugieren que el nivel de dormición de los frutos estaría determinado por la sensibilidad al ABA de los embriones y es modulado fuertemente por el AM. Asimismo, y centrando el análisis en las FS tempranas, los embriones del genotipo 1579 presentaron una mayor sensibilidad al efecto inhibitorio del ABA que los embriones del genotipo 1552 (Fig. 3.11, Fig. 3.12, Fig. S3.5). Cabe mencionar que, a medida que transcurrió el almacenaje post-cosecha, la sensibilidad al ABA de los embriones fue disminuyendo, conforme aumentó el porcentaje de germinación del fruto, en ambos genotipos y FS. Diversos trabajos relacionan la disminución de la sensibilidad al ABA con la salida de la dormición de los frutos durante la post-maduración (Le Page-Degivry et al., 1996;

Grappin et al., 2000; Argyris et al., 2008; Bradford et al., 2008; Schramm et al., 2013; Rodríguez et al., 2018) y la variabilidad genotípica para este carácter (Walker-Simmons, 1987; Wang et al. 1995; Steinbach et al., 1995; Corbineau et al., 2000; Benech-Arnold et al., 2006; Gualano et al., 2007; Barrero et al., 2009; Arata et al., 2021). Los resultados provistos por este capítulo aportan evidencia robusta (dos genotipos y en tres años diferentes) de que los cambios en la FS afectan la sensibilidad al ABA de los embriones, y esta sensibilidad a su vez, determina el nivel de dormición de los frutos en la post-cosecha.

Se ha propuesto en varias especies, como cebada y girasol, que las cubiertas del fruto restringen el flujo de oxígeno hacia el embrión (Gay et al., 1991; Corbineau y Côme, 1995; Benech-Arnold et al., 2006; Domínguez et al., 2019) limitando su capacidad de germinar. En girasol, las cubiertas del fruto (particularmente la cubierta seminal) imponen al embrión una condición de hipoxia (Rolletschek et al., 2007; menos de 3% O<sub>2</sub>, *Rodríguez comunicación personal*), tanto durante el desarrollo como durante la incubación. Esta condición de hipoxia determina, a su vez, un aumento de la sensibilidad al ABA de los embriones (Domínguez et al., 2019). En el presente trabajo, frutos del genotipo 1579 (Fig. 3.13B) y semillas del genotipo 1552 (Fig. 3.13A) de FS tempranas presentaron un mayor nivel de inhibición de la germinación en condición de hipoxia (3% O<sub>2</sub>) que aquellos provenientes de FS tardías. A su vez, embriones del genotipo 1579 de FS tempranas presentaron un aumento mayor en la sensibilidad al ABA en hipoxia que el observado para embriones de FS tardías (Fig. 3.14). Se ha sugerido que cambios en la concentración de oxígeno dentro del embrión por efecto de las cubiertas pueden afectar la tasa de catabolismo del ABA o de otros inhibidores de la germinación (Krochko et al., 1998; Barthe et al., 2000; Cutler et al., 2000), como así también la sensibilidad de los tejidos al ABA (Benech-Arnold et al., 2006; Bradford et al., 2008; Menciondo et al., 2010,



Domínguez et al., 2019). Esta relación entre la sensibilidad de los embriones al O<sub>2</sub> exacerbada por la presencia de ABA nos da una idea de cómo la dormición del fruto entero, mediado por cambios en la FS, estaría regulada por una combinación de factores fisiológicos (sensibilidad al ABA del embrión) y físicos (difusión de O<sub>2</sub> a través del pericarpo) durante la post-cosecha.

El control materno de la dormición de los frutos en respuesta al atraso en la FS disminuyó el espesor del pericarpo en ambos genotipos (Fig. 3.15). Esto se asoció al adelgazamiento de la capa media del pericarpo y al menor número de células de la misma sección. En muchas especies, el AM regula el nivel de dormición a través de cambios en el grosor de la cubierta de la semilla (Karssen, 1970; Pourrat y Jacques, 1975; Dorne, 1981; Lacey et al., 1997; Fernández Farnocchia et al., 2021). En general se ha observado que un menor nivel de radiación incidente (Lindstrom et al., 2007; Pizzorno, 2021) y días cortos (Ceccato et al., 2015), condiciones que tienen lugar en FS tardías, disminuyen el espesor del pericarpo. Estos cambios estructurales podrían aumentar la permeabilidad física de las cubiertas a la difusión de O<sub>2</sub> (Lenoir et al., 1986). En el presente trabajo esta característica podría estar provocando una menor o más lenta difusión de O<sub>2</sub> al embrión en FS tempranas, determinando un mayor nivel de hipoxia al embrión que exagera la respuesta al ABA y explicando, en parte, el mayor nivel de dormición de los frutos en estas FS. Por otro lado, frutos con pericarpos más finos podrían determinar una imbibición más rápida del embrión. Debeaujon et al. (2000) reportaron que semillas mutantes de testa de *Arabidopsis* deficientes en pigmentación y de menor peso y tamaño, y que presentaban un nivel de dormición menor que el 'wild type', mostraron una mayor tasa de ingreso de sales de tetrazolio que las semillas 'wild type', sugiriendo que esta mayor permeabilidad al agua podría explicar, en parte, la mayor germinación de los mutantes de testa.

Además de los efectos sobre distintas propiedades del pericarpo, las condiciones ambientales durante el desarrollo de los frutos de girasol en la planta madre determinaron cambios en el potencial de crecimiento de los embriones, donde embriones de FS tardías presentaron un mayor porcentaje de germinación a menores potenciales agua que los embriones de FS tempranas (Fig. 3.16). Esto refuerza la idea de que los cambios en el AM producto de variaciones en la FS afectan el comportamiento germinativo de los embriones. Los cambios observados en la sensibilidad al osmótico estarían relacionados con la diferente sensibilidad al ABA de los embriones en función de la FS. El ABA puede imponer una restricción al potencial de crecimiento del embrión, afectando su capacidad de expansión (Nonogaki, 2006).

Los resultados presentados en este capítulo revelan algunos de los mecanismos relacionados al metabolismo y sensibilidad al ABA a través de los cuales, cambios en el AM provocados por variaciones en la FS, regulan la dormición en frutos de girasol. Estos mecanismos estarían en parte asociados a cambios en el contenido y la capacidad de síntesis *de novo* de ABA de los embriones durante el desarrollo de los frutos en la planta madre, y a variaciones en la sensibilidad al ABA de los embriones a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha. Asimismo, otro efecto de la FS estaría relacionado con la imposición de hipoxia del pericarpo al embrión, que exacerba la sensibilidad al ABA del mismo. Los resultados obtenidos sugieren que la sensibilidad de los embriones al ABA durante el almacenaje post-cosecha, mecanismo responsable de la dormición de los frutos, estaría determinada por el contenido de ABA y la capacidad de los embriones de sintetizar ABA durante su desarrollo.

## **CAPÍTULO 4. Efecto del ambiente térmico explorado durante la etapa de desarrollo del fruto en la planta madre sobre el nivel de dormición en frutos de girasol**

### **4.1. Introducción**

En los capítulos anteriores (2 y 3) se estudió el efecto de variaciones en la FS sobre el nivel de dormición de los frutos de girasol. Las variaciones en la FS exponen a las plantas a cambios en la radiación incidente, el fotoperiodo y la temperatura que exploran los cultivos durante la etapa de desarrollo de las semillas. Dentro de estos factores, existen claras evidencias de que cambios en el ambiente térmico durante el desarrollo de las semillas provocan cambios significativos en el nivel de dormición de las mismas en una amplia gama de especies (Rodríguez et al., 2003; Kendall et al., 2011; Chen et al., 2014; Macgregor et al., 2015; Penfield y MacGregor, 2017). De hecho, este ha sido el factor del AM más estudiado. En la mayoría de las especies estudiadas, se ha observado que plantas que exploran mayores temperaturas durante el desarrollo de las semillas producen semillas con un menor nivel de dormición. Dentro de este grupo, podemos encontrar especies como *Beta vulgaris*, *Lactuca sativa*, *Amaranthus retroflexus*, *Avena fatua* (Fenner, 1991), trigo (Biddulph et al., 2007; Barrero et al., 2020), lechuga (Contreras et al., 2009), arroz silvestre (Gu et al., 2006) y *Arabidopsis* (Donohue et al., 2008; Kendall et al., 2011; He et al., 2014), entre otras. Por el contrario, semillas de otras especies de interés agrícola como la soja (*Glycine max*) (Keigley y Mullen, 1986; Smith et al., 2008) y quinoa (Ceccato et al., 2011) presentaron un mayor nivel de dormición a cosecha asociado a la ocurrencia de altas temperaturas durante el desarrollo de las semillas. Un comportamiento similar se reportó para girasol, donde mayores temperaturas durante el desarrollo de los frutos determinaron un mayor nivel de dormición y una menor tasa de salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha (Bodrone et al., 2017). En trabajos con cebada y girasol se ha

observado que esta regulación tendría lugar en las etapas finales del período de desarrollo de las semillas, luego de la MF (Rodríguez et al., 2001; Gualano et al., 2014; Bodrone et al., 2017).

La dormición que presentan los frutos de girasol es del tipo fisiológica, y las estructuras del fruto que imponen la dormición pueden ser las cubiertas y/o el embrión (Bewley et al., 2013). El ambiente térmico durante el desarrollo de los frutos de girasol ejerce un efecto diferencial sobre las estructuras que imponen la dormición del fruto. Bodrone et al. (2017) observaron que la exposición de las plantas a altas temperaturas durante el desarrollo de los frutos provocó una reducción de la dormición embrionaria mientras que, en forma contraria, determinó un aumento de la dormición impuesta por el pericarpo y la cubierta seminal. Un comportamiento similar fue observado en semillas de *Chenopodium quinoa* (Ceccato et al., 2011).

Las hormonas vegetales ABA y GAs desempeñan un papel fundamental en la regulación de la dormición fisiológica en muchas especies (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). El nivel endógeno y la sensibilidad de los tejidos a las hormonas ABA y GA son los mecanismos principales que hacen a la transición de un nivel de dormición alto a bajo (Bewley et al., 2013). Existen evidencias de que los cambios en el nivel de dormición de las semillas como resultado de variaciones en el ambiente térmico que exploran las semillas durante su desarrollo estarían determinadas en parte por variaciones en estos mecanismos (Walker-Simmons y Sessing, 1990; Garello y Le Page-Degivry, 1999; Contreras et al., 2009). Por ejemplo, en *Arabidopsis*, el menor nivel de dormición que presentan las semillas maduras, cuando se desarrollaron en un ambiente de alta temperatura se explica por un menor contenido de ABA y mayor de GAs (Kendall et al., 2011). En el caso del girasol, resultados preliminares han sugerido que la mayor sensibilidad al ABA de frutos provenientes de un ambiente de altas temperaturas parecería ser uno de los

mecanismos que estaría explicando el mayor nivel de dormición de los frutos que maduran bajo estas condiciones (Bodrone et al., 2017).

Más allá de que el efecto del ambiente térmico sobre la dormición ha sido estudiado en varias especies, existen escasos estudios en relación a sus efectos en el cultivo de girasol, y menos aún información concluyente en relación a los mecanismos que estarían involucrados en esta regulación. Estudiar esta regulación en el cultivo de girasol resulta esencial para comprender cómo el ambiente térmico regula la dormición en frutos de esta especie, y predecir su efecto en condiciones de cultivo, sobre todo en el contexto actual de cambio climático. Asimismo, profundizar sobre los componentes estructurales y hormonales que explicarían los cambios en el nivel de dormición frente a cambios en la temperatura durante el desarrollo de los frutos resulta fundamental para comprender la regulación de este proceso a nivel fisiológico.

Este capítulo ha tenido por objetivo estudiar, en dos FS contrastantes, el efecto de la temperatura materna sobre (i) el nivel de dormición durante el desarrollo, a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha en frutos de girasol y (ii) su relación con el contenido endógeno de ABA, la capacidad de síntesis de ABA en embriones en desarrollo, la sensibilidad de los embriones al ABA, GAs y etileno y la influencia de la hipoxia sobre este último mecanismo (sensibilidad al ABA). A su vez, se determinó (iii) el momento del desarrollo de los frutos (antes o después de MF) en el que tendría lugar la regulación de la dormición por efecto del ambiente térmico.

## **4.2. Materiales y Métodos**

### **4.2.1. Sitio de los ensayos y material vegetal.**

Los experimentos se realizaron en el campo experimental del IFEVA, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (34°25' S, 58°25' O) en la

campaña 18/19. El genotipo de girasol utilizado fue el 1552 (ver *Cuadro 2.1.*, capítulo 2), el cual se sembró en dos FS contrastantes: Temprana (21/9/2018) y Tardía (4/1/2019).

#### 4.2.2. Condiciones generales de los ensayos y tratamientos térmicos.

En el *experimento III* se sembraron 60 macetas de 30 litros por FS que se dispusieron sobre una plataforma en el campo de manera equidistante (Fig. 4.1). Como sustrato se utilizó una mezcla de 55% de tierra negra, 25% de humus de lombriz, 10% de materia orgánica y 10% de perlita.



**Fig. 4. 1.** Estadios iniciales del cultivo en las macetas.

El ensayo se mantuvo libre de enfermedades y plagas, y se regó diariamente. Al momento de antesis (R5.1) se realizó la polinización manual (Fig. 4.2). Los datos meteorológicos fueron registrados por una estación meteorológica ubicada en el sitio experimental (Davis Vantage Pro2).



**Fig. 4. 2.** Cultivo en distintas etapas de pre antesis y antesis. Se puede observar cómo las macetas se encuentran equidistantes entre sí, para asegurar una competencia interplanta uniforme.

De las 60 plantas iniciales se seleccionaron 44 según su fecha de antesis ( $\pm 3$  días), las cuales se asignaron aleatoriamente al tratamiento control (22 plantas fuera del invernáculo) y al tratamiento de alta temperatura “+T” (22 plantas dentro del invernáculo). En R6 las plantas asignadas a +T fueron trasladadas desde el campo al interior del invernáculo (Fig. 4.3). Tres plantas de ambos tratamientos (control y +T) fueron utilizadas para seguir la dinámica de peso seco y humedad del fruto desde R6 hasta la MC (11% de humedad). El momento de inicio de tratamiento térmico se eligió para asegurar la fecundación de los frutos del tercio medio del capítulo. De aquí en más la nomenclatura utilizada para distinguir las FS y los tratamientos térmicos será: FSTe–C (FS Temprana–Control), FSTe–T (FS Temprana–+T), FSTa–C (FS Tardía–Control) y FSTa–T (FS Tardía–+T).



**Fig. 4. 3.** Plantas en el invernáculo. En el techo, se observa el sensor de temperatura y humedad relativa (HOBO InTemp Temp/Relative Humidity Data Logger–CX450), que registró datos de forma horaria.

El vidrio del invernáculo redujo la radiación incidente en 21.9% (FS temprana) y 19.8% (FS tardía) (medido con un radiómetro –Cavadevices– al mediodía y los días sin nubosidad). Para igualar el nivel de radiación de las plantas dispuestas en el campo, en el tratamiento control se utilizaron media sombras (Fig. 4.4) que determinaron valores de



**Fig. 4. 4.** Plantas control, fuera del invernáculo. Sensores portátiles registran datos de temperatura horaria (DAT-10, Datalogger de temperatura y humedad, Schwyz, China).

sombreo similares a los registrados en el invernáculo: 22.8% (FS temprana) y 20.6% (FS tardía). El invernáculo permaneció parcialmente abierto durante las horas del mediodía y tarde (12 a 16 h) para evitar la acumulación de humedad y gases ( $\text{CO}_2$ ). Asimismo, en 10 plantas por FS y tratamiento térmico, se midió en horas del mediodía la tasa fotosintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ) y el contenido relativo de agua (CRA, en %) en la quinta hoja desde el capítulo. La primera medición se realizó con un sistema de fotosíntesis portátil Li-6200 (Li-Cor, Lincoln, NE, EE.UU.) utilizando una cámara de 0.25 l conectada a una potencia de luz roja portátil regulada (QB1 205LI-670, Quantum Devices Inc., Barneveld, WI) a  $1500 \text{ mol m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$  PPF. El CRA se estimó siguiendo la metodología propuesta por Barr y Weatherley (1962), que consiste en tres pasos. Brevemente, se cortaron muestras de discos ( $2 \text{ cm}^2$ ) de la hoja que fueron pesados inmediatamente para obtener su peso fresco (PF). Seguidamente, se dejaron flotar los mismos discos durante 2 horas en placas de Petri con agua destilada y, tras un suave secado para eliminar el exceso de agua, se pesaron para obtener el peso turgente (PT). Por último, se pesaron los discos después de secarlos a  $60^\circ\text{C}$  durante 48 horas hasta alcanzar el peso seco constante (PS). Determinados estos tres parámetros se calculó el CRA mediante la siguiente ecuación:

$$\text{CRA (\%)} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$$



Al momento de MF, estimado según Ploschuk y Hall (1995, ver capítulo 2 *sección* 2.2.4), 5 plantas de la FS Temprana provenientes del tratamiento control fueron transferidas al invernáculo (C→T) y 5 plantas del tratamiento +T fueron trasladadas del invernáculo al campo (+T→C), conformando el *experimento IV*.

Llegada la MC, los capítulos se cortaron y trillaron manualmente. Sólo se seleccionaron los frutos provenientes del tercio medio de los capítulos para realizar los ensayos de germinación. El secado y almacenaje de los frutos se realizó según la metodología explicada en la *sección* 2.2.2. (capítulo 2).

#### 4.2.3. Ensayos de germinación.

##### 4.2.3.1. Momentos de muestreo.

Se realizaron ensayos de germinación durante la etapa de desarrollo de los frutos (40% y 25% de humedad), a cosecha (luego del secado a 6%) y a los 30 y 90 días durante el almacenaje post-cosecha.

##### 4.2.3.2. Características de los ensayos de germinación.

Se colocaron 25 frutos (frutos intactos) y 25 embriones (sin pericarpo ni cubierta seminal) en placas de Petri de 9 cm de diámetro (n=3) sobre dos discos de papel de filtro humedecidos con 5 ml de agua destilada o con soluciones de distintas concentraciones de hormonas (ABA, GAs y etefón) según corresponda. En las soluciones de ABA se incluyó al fluridone (F100). Los frutos y embriones se incubaron a 10 y 25°C (en los muestreos en desarrollo se incubó sólo a 25°C) por 15 días. La remoción del pericarpo y cubierta seminal, el criterio de germinación y la frecuencia de recuento de germinación se llevaron a cabo tal como se explicó en la *sección* 2.2.3 del capítulo 2.

#### 4.2.4. Determinación del contenido endógeno y la capacidad de síntesis de ABA durante el desarrollo de los frutos.

Con el objetivo de determinar la dinámica del contenido de ABA de los embriones durante el desarrollo del fruto en la planta madre, se extrajeron frutos hacia el final de su período de desarrollo. Se separaron los ejes embrionarios del resto de las estructuras del fruto, que fueron congelados en nitrógeno líquido, liofilizados, pesados y molidos para la extracción acuosa de ABA. La cuantificación de los extractos de ABA se realizó por radioinmunoanálisis (Steinbach et al., 1995; ver *sección 3.2.4* del capítulo 3) y los datos se expresaron en pg ABA mg PS<sup>-1</sup> de la muestra original.

Con el objetivo de determinar la capacidad de síntesis de ABA de los embriones, se incubaron frutos con 25% de humedad. A las 24 horas (25% y cosecha) y 48 horas (25%) de incubación, se extrajeron 20 frutos de cada una de las soluciones y se separó el eje embrionario, para luego hacer la determinación de ABA por radioinmunoanálisis (Steinbach et al., 1995; ver *sección 3.2.4* del capítulo 3). Además, se evaluó la germinación de frutos y embriones en ambos momentos y soluciones. Ambas determinaciones (nivel endógeno de ABA durante el desarrollo y síntesis de ABA *de novo*) se realizaron en embriones provenientes de ambas FS del experimento III.

#### 4.2.5. Sensibilidad de los embriones a la hipoxia y su efecto sobre la sensibilidad de los embriones al ABA.

Triplicados de veinte embriones se incubaron a 25°C en agua y en distintas soluciones de ABA (1, 5, 10 y 50µM) en una atmósfera de 21% y de 3% de O<sub>2</sub>. Para la incubación, los embriones se dispusieron sobre un papel de filtro colocado sobre una capa de algodón hidratada con 50 ml de las soluciones descritas. El recuento de germinación fue a los 7 días de incubación. La concentración de hipoxia (3%O<sub>2</sub>) se generó en una

cámara plástica hermética (ver *sección 3.2.6* del capítulo 3). Esta determinación se realizó en embriones provenientes de ambas FS del experimento III a los 40 días de almacenaje post-cosecha.

#### 4.2.6. Análisis estadísticos.

Las variables ambientales (temperatura y humedad relativa), los valores de fotosíntesis, CRA, los subcomponentes del peso seco final del fruto y el contenido de ABA se analizaron mediante un análisis de varianza y posterior test de Tukey para la separación de medias con un nivel de significancia del 5%. La evolución del peso seco del fruto y de la pérdida de humedad del mismo se ajustó a los modelos explicados en el capítulo 2 *sección 2.2.4*. Se presentan los valores medios y los EE de la germinación final (luego de los 15 días de incubación). En los casos donde se requirió hacer inferencia estadística en los datos de germinación, se llevaron a cabo análisis no paramétricos (Kruskal–Wallis), con un nivel de significancia del 5%, ya que los registros de germinación no se distribuyen normalmente. Los softwares utilizados fueron Infostat (Di Rienzo et al., 2012) y GraphPad Prism 7 (Motulsky, 2003).

### **4.3. Resultados**

#### 4.3.1. Descripción del ambiente térmico y del llenado y secado del fruto. Experimento III.

Las temperaturas medias, máximas y mínimas exploradas por las plantas desde fin de anthesis (R6) hasta la MC difirieron según la FS (p-valor<0.0001 para las tres temperaturas) y los tratamientos térmicos (Temperatura media y media máxima: p-valor<0.0001, Temperatura media mínima: p-valor=0.0067) (Cuadro 4.1). No se observó un efecto combinado de ambos factores (p-valor FS\*Temperatura>0.05 en las tres

temperaturas). En FSTe y FSTa del tratamiento +T, las plantas estuvieron expuestas a temperaturas medias 2.98°C y 2.57°C mayores al control, respectivamente. Mayores diferencias se observaron en la temperatura media máxima, donde las diferencias a favor del tratamiento +T fueron de 6°C y 8.7°C para FSTe y FSTa, respectivamente. Diferencias menores se observaron en la temperatura media mínima entre FS y tratamientos térmicos. La humedad relativa difirió entre FS (p-valor=0.0238) y tratamientos térmicos (p-valor=0.0032), siendo mayor para las FS tardías y dentro del invernáculo.

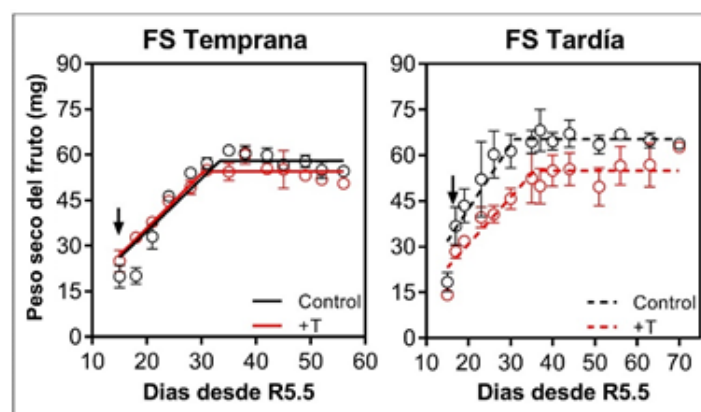
**Cuadro 4. 1.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables térmicas registradas entre R6-MC, según FS y tratamiento térmico. Abreviaturas: TMd (°C): Temperatura Media diaria, en °C; TMMxd (°C): Temperatura Media Máxima diaria, en °C; TMMnd (°C): Temperatura Media Mínima diaria, en °C; HRMd (%): Humedad Relativa Media diaria, en %.

FS- Tratamiento	TMd (°C)	TMMxd (°C)	TMMnd (°C)	HRMd (%)
FSTe-C	26.7 ( $\pm$ 5.9)	34.9 ( $\pm$ 3.8) [41.3]	20.1 ( $\pm$ 2.9) [11.9]	62.8 ( $\pm$ 9.3)
FSTe-T	29.7 ( $\pm$ 7.7)	40.9 ( $\pm$ 3.9) [44.5]	21.6 ( $\pm$ 2.5) [14.3]	67.5 ( $\pm$ 9.9)
FSTa-C	21.2 ( $\pm$ 6.2)	30.5 ( $\pm$ 3.4) [37.1]	14.9 ( $\pm$ 3.8) [8.2]	66.6 ( $\pm$ 6.3)
FSTa-T	23.8 ( $\pm$ 8.1)	39.2 ( $\pm$ 5.6) [46.0]	16.2 ( $\pm$ 3.2) [10.6]	69.2 ( $\pm$ 7.7)

La tasa fotosintética (Cuadro S4.1) no difirió significativamente entre tratamientos térmicos evidenciando que el aumento de la temperatura y el confinamiento de las plantas dentro del invernáculo no afectaron la fotosíntesis. Sin embargo, FS tempranas presentaron valores de fotosíntesis mayores a las tardías (p-valor<0.0001). Estas diferencias podrían explicarse, en parte, por el efecto de la menor radiación que exploraron las plantas en FS tardías (Cuadro 3.1; Cuadro S3.1). Este factor ambiental es el que modula la tasa fotosintética en condiciones sin estrés (Berzsenyi et al., 2006). Por su parte, el contenido relativo de agua fue significativamente diferente entre tratamientos (FS\* Temperatura: p-valor=0.0005). El mayor contenido relativo de agua se observó en FSTa-T, tratamiento que exhibió el mayor porcentaje de humedad relativa ambiental (Cuadro 4.1). Esta condición podría haber determinado un menor déficit de presión de vapor y una menor transpiración de las hojas. Más allá de estas consideraciones los

valores de contenido relativo de agua obtenidos en los distintos tratamientos, en conjunto con los valores de fotosíntesis, evidencian que el tratamiento +T no determinó una condición diferencial en relación al *status* hídrico de las plantas.

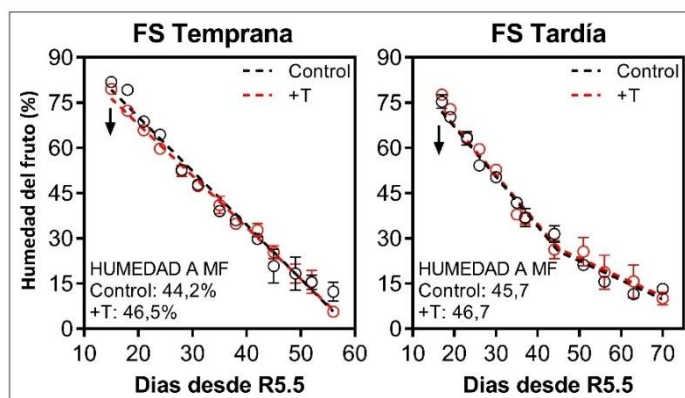
La tasa y duración del llenado no difirieron significativamente entre tratamientos ( $p\text{-valor} > 0.05$  para la interacción y los efectos principales de ambos factores; Fig. 4.5, Cuadro S4.2). Esto determinó que el peso seco final de los frutos tampoco difiera entre tratamientos (Fig. 4.5, Cuadro S4.2), aunque los provenientes de los tratamientos +T presentaron un peso levemente menor que el control. Generalmente se ha observado que plantas de girasol expuestas a mayores temperaturas durante el desarrollo del fruto presentan frutos de menor peso, asociados a una menor duración del llenado (Connor y Hall, 1997). Sin embargo, este efecto depende de la temperatura y en qué momento fueron expuestas las plantas a esa temperatura (Chimenti et al., 2001; Rondanini et al., 2003). En nuestros resultados de peso seco final del fruto no encontramos diferencias atribuibles a los tratamientos térmicos, posiblemente por la reducida magnitud de la diferencia entre los mismos (que fue de  $3^{\circ}\text{C}$ ) y/o porque las temperaturas medias fueron inferiores a los  $30^{\circ}\text{C}$  (Cuadro 4.1). Tampoco se evidenciaron diferencias en el peso seco final de los



**Fig. 4. 5.** Evolución del peso seco unitario del fruto (mg) en función de los días desde anthesis (R5.5) según FS (Temprana o Tardía) y tratamiento térmico (Control o +T), del experimento III. Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los puntos representan datos promedio del peso seco ( $\pm\text{EE}$ ,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las fechas de cosecha para cada FS y tratamiento térmico fueron: FSTe-C: 20/1/2019; FSTe-T: 20/1/2019; FSTa-C: 1/5/2019; FSTa-T: 1/5/2019. Las flechas indican el momento en el que comenzó el tratamiento térmico (R6).

frutos entre FS, tal como evidenciamos en algunos casos expuestos en los capítulos anteriores (Cuadro S2.3, Fig. 3.1B, Fig. 3.1C, Fig. 3.1E, Cuadro S3.2). Esto llama la atención porque con menores tasas de fotosíntesis en las FS tardías, el peso de los frutos es similar a las FS tempranas. Este comportamiento podemos explicarlo mediante dos posibles mecanismos de compensación parcial del rendimiento sobre el peso del fruto que ocurriría en las siembras de verano: (i) menor número final de frutos, como consecuencia de niveles de radiación restrictivos en el cuaje de los frutos (Cantagallo y Hall, 2002; Cantagallo et al., 2004) y/o (ii) mayor removilización de reservas debido a la limitada disponibilidad de nuevos asimilados fotosintéticos (Dosio et al., 2000; López Pereira et al., 2008; Andrianasolo et al., 2017).

Las tasas de secado del fruto de las FS tempranas fueron mayores a las obtenidas en las FS tardías (Fig. 4.6, Cuadro S4.3), en ambos tratamientos térmicos. De manera similar a lo presentado en los capítulos 2 y 3, en las FS de enero se observó una velocidad de secado inicial mayor y una final menor (modelo bilineal), asociado a la disminución de la temperatura, radiación incidente y el aumento de la humedad ambiental que ocurre en otoño. En todos los casos, el momento de MF ocurrió con valores de humedad de fruto



**Fig. 4. 6.** Evolución de la humedad del fruto (%) en función de los días desde anthesis (R5.5) según FS (Temprana o Tardía) y tratamiento térmico (Control o +T), del experimento III. Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los puntos indican el promedio del porcentaje de humedad ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Se ajustó un modelo lineal a los datos de humedad de las FSTe-T y modelos bilineales para FSTe-C, FSTa-C y FSTa-T. Las tasas de secado de ambas FS se encuentran en el Cuadro S4.3 Para cada caso, se resalta el contenido de humedad promedio ( $\pm$ EE,  $n=3$ ) de los frutos al momento de

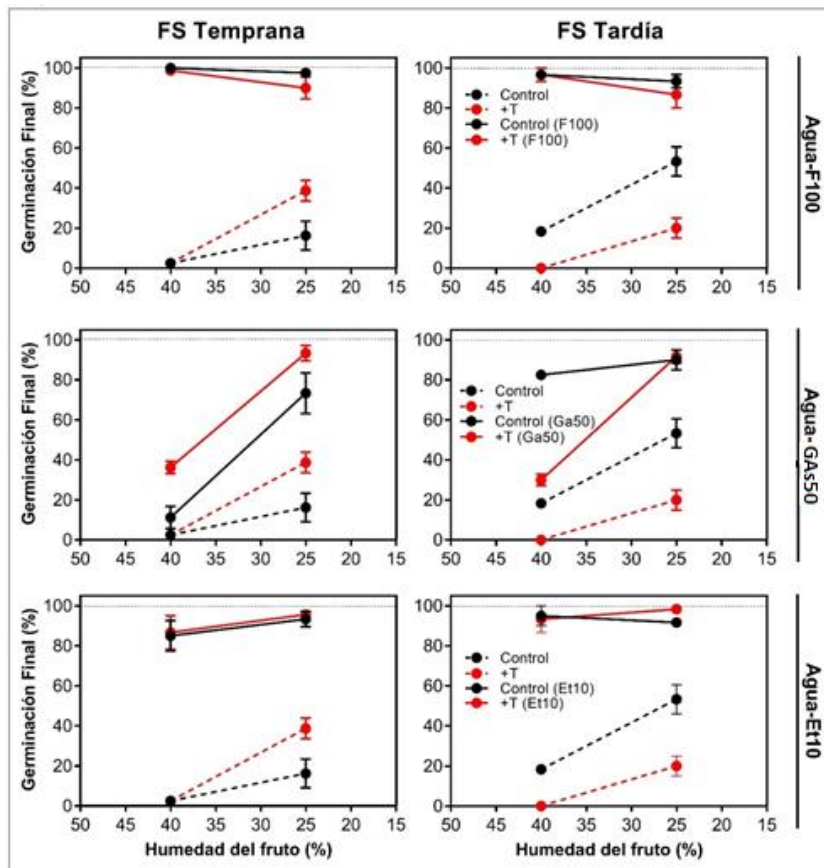
de alrededor 44% y 46% (Fig. 4.6). El tiempo entre MF y MC difirió entre FS. Para FSTe-C esta etapa se completó, en promedio, en 18 días, mientras que para FSTe-T en 21 días. Por su parte, para FSTa-C y FSTa-T esta etapa ocurrió en 39 y 38 días, respectivamente.

#### 4.3.2. Germinación de embriones en desarrollo. Experimento III.

##### 4.3.2.1. Fluridone, GAs y etefón.

La germinación de los embriones en desarrollo (40% y 25% de humedad del fruto) incubados en agua destilada difirió entre FS y tratamientos térmicos (líneas punteadas; Fig. 4.7). Para la FS temprana, los embriones provenientes de frutos de 40% de humedad presentaron un porcentaje nulo de germinación en ambos tratamientos térmicos. Cuando los frutos avanzaron en su maduración (25%), los embriones del tratamiento FSTe-T presentaron una germinación mayor (38.75%) que los del FSTe-C (16.25%). En la FS tardía se observó una respuesta contraria: los embriones de FSTa-C presentaron un porcentaje de germinación mayor que FSTa-T, en ambos muestreos.

Cuando se agregó F100 y etefón a la solución (primer y tercer panel de figuras; Fig. 4.7), se observó una promoción de la germinación cercana al máximo (100%) para los cuatro tratamientos. Por otro lado, la respuesta de los embriones de ambas FS al efecto promotor de las GAs (segundo panel de figuras; Fig. 4.7) aumentó conforme avanzó el desarrollo sin observarse diferencias apreciables en la respuesta, exceptuando a los embriones de 40% de humedad de la FSTa, donde el tratamiento control presentó una mayor respuesta que el +T. En relación a la sensibilidad de los embriones a las hormonas que promueven la germinación (GAs y etefón), no se observaron diferencias entre tratamientos en la respuesta germinativa de los embriones en la FS tardía (Fig. S4.1); sólo se observó una mayor respuesta a la menor dosis de GAs y etefón en embriones de FSTe-T en comparación con FSTe-C.

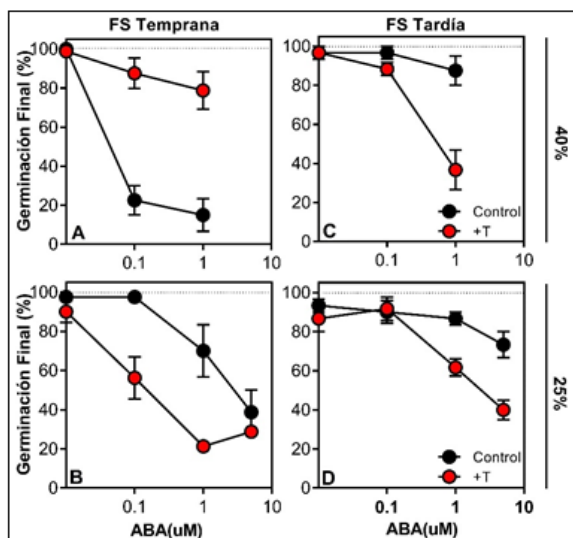


**Fig. 4.7.** Porcentaje final de germinación de embriones, incubados a 25°C, según FS y tratamiento térmico, provenientes de frutos en desarrollo con un 40% y 25% de humedad, del experimento III. Se exhibe la respuesta germinativa en diferentes medios de incubación: agua (líneas punteadas), F100, GAs 50 $\mu$ M y etefón 10 $\mu$ M (líneas llenas). Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

#### 4.3.2.2. Sensibilidad al ABA de embriones en desarrollo.

La FS y el tratamiento térmico afectaron la germinación de embriones inmaduros incubados en soluciones de ABA. En el muestreo de 40% de humedad de los frutos, los embriones de FSTe–T mostraron menor sensibilidad al ABA que los provenientes de FSTe–C (Fig. 4.8A). Sin embargo, cuando avanzó la madurez (25% de humedad) (Fig. 4.8B) la respuesta se invirtió: los embriones de FSTe–C fueron menos sensibles al ABA exógeno que los de FSTe–T. En la FS tardía los embriones del tratamiento control presentaron menor sensibilidad al ABA que los de +T en ambos muestreos (Fig. 4.8C; Fig. 4.8D).



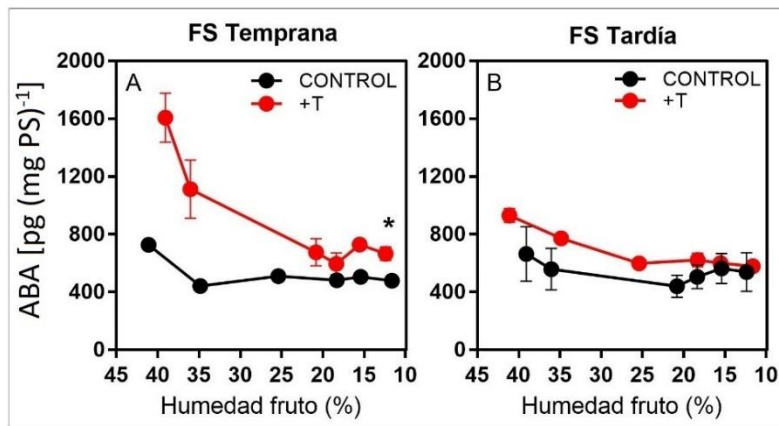


**Fig. 4. 8.** Porcentaje final de germinación de embriones, incubados a 25°C, en función de la concentración de ABA, según FS y tratamiento térmico, provenientes de frutos en desarrollo con un 40% y 25% de humedad, del experimento III. Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en F100.

#### 4.3.3. Contenido endógeno de ABA.

##### 4.3.3.1. Durante la etapa final del desarrollo del fruto en la planta madre.

Las FS y tratamientos térmicos determinaron diferencias en el contenido endógeno de ABA de los ejes embrionarios (Fig. 4.9). Los ejes de embriones pertenecientes a FSTe-T (Fig. 4.9A) mostraron un contenido de ABA mayor que los pertenecientes a FSTe-C durante toda la etapa final de desarrollo del fruto en la planta madre. En la FS tardía (Fig. 4.9B) no se observaron diferencias entre tratamientos térmicos, presentando valores similares de contenido de ABA a cosecha. El contenido endógeno de ABA de los tratamientos control no difirió entre FS, lo que contrasta con los resultados reportados en el capítulo 3 (Fig. 3.6), donde el nivel de ABA endógeno fue mayor en las FS tempranas. Sin embargo, las comparaciones entre FS no son válidas en este caso, ya que corresponden a diferentes determinaciones por radioinmunoensayo (no se pueden comparar muestras que no fueron analizadas en la misma corrida).



**Fig. 4. 9.** Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en función del porcentaje de humedad de frutos en ejes embrionarios extraídos de frutos provenientes de los tratamientos de FS y temperatura, del experimento III. Los puntos y líneas negras representan al tratamiento control, mientras que los puntos y líneas rojas, al tratamiento +T. Los puntos indican la media del contenido endógeno de ABA ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. El asterisco en la FS temprana indica que hay diferencia significativa en los contenidos de ABA a cosecha entre tratamientos térmicos (p-valor=0.016). La MF de los frutos ocurrió con los siguientes porcentajes de humedad, según FS y tratamiento térmico: FSTe-C 44.2%; FSTe-T 46.5%; FSTa-C 45.7%; FSTa-T 46.7%.

#### 4.3.3.2. Durante la incubación, en frutos con 25% de humedad.

El contenido de ABA de ejes embrionarios durante la incubación varió en función de la FS y el tratamiento térmico (Cuadro 4.2). Antes de la incubación, las FS tempranas y los tratamientos +T presentaron los mayores niveles de ABA endógeno (p-valor<sub>FS</sub>=0.025 y p-valor<sub>tratamiento térmico</sub><0.001; la interacción entre FS y tratamiento térmico no fue significativa: p-valor=0.112). La incorporación de un inhibidor de la síntesis de ABA (F100) al medio de incubación provocó un aumento en la germinación final de embriones (Cuadro 4.2) a valores superiores al 85%, independientemente del tratamiento. Por su parte, los frutos de ambas FS y tratamientos térmicos no germinaron (datos no presentados). La comparación del contenido de ABA luego de 24 horas de incubación en presencia o ausencia del inhibidor permitió estimar la capacidad diferencial de síntesis de ABA en los distintos tratamientos. Se observó que la capacidad de síntesis en los ejes provenientes del tratamiento +T para ambas FS fue significativa y mayor que para los

ejes del tratamiento control (p-valor tratamiento térmico\*solución *(agua o F100)*=0.007; Cuadro 4.2). A su vez, embriones del tratamiento FSTe–T presentaron una mayor capacidad de síntesis de ABA en la incubación que los embriones de la FSTa–T (p-valor<sub>(FS\*tratamiento térmico)</sub>=0.006). Por su parte, a cosecha (luego del secado), los ejes embrionarios provenientes de tratamientos de alta temperatura presentaron mayor contenido de ABA, en ambas FS (FS temprana: 369.8±9.3 vs 646.9±22.7 pg ABA mg PS<sup>-1</sup>, para el tratamiento control y de +T, respectivamente; FS tardía 452.6±11.8 vs 524.7±21.0 pg ABA mg PS<sup>-1</sup>, para el tratamiento control y de +T, respectivamente).

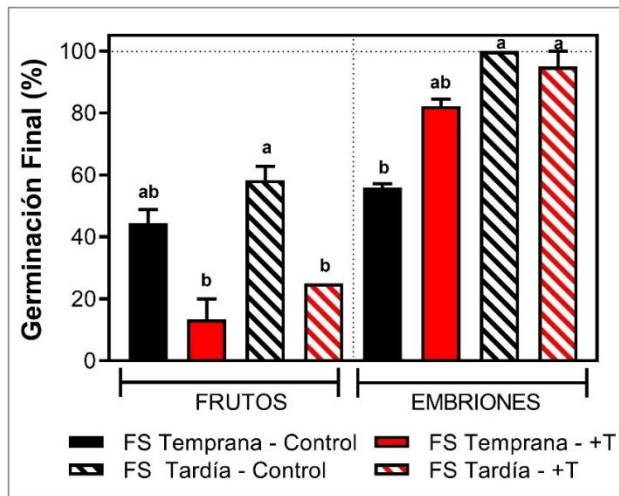
**Cuadro 4. 2.** Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en ejes embrionarios provenientes de frutos de 25% de humedad, incubados en agua destilada y F100 a 25°C, según FS y tratamiento térmico, del experimento III. El contenido de ABA se midió en dos momentos: al comienzo y a las 24 horas de incubación. En este último momento se estimó la síntesis de ABA *de novo*. Se presentan datos medios de contenido de ABA (±EE, n=3). Se realizaron dos análisis de varianza, por momento (antes y a las 24 de incubación\*), con su correspondiente test de Tukey. En todos los casos se indica la media (±EE, n=3) de germinación final embriones (GE!), luego de 15 días de incubación, junto con la diferencia significativa (embriones: p-valor=0.004).

	FS Temprana		FS Tardía	
	Control	+T	Control	+T
<i>Comienzo incubación*</i>	541.5 (±28.0) <sup>bc</sup>	749.4 (±53.8) <sup>a</sup>	479.3 (±27.2) <sup>c</sup>	600.0 (±52.4) <sup>b</sup>
<i>24 horas*</i>				
Sin F100	738.6 (±2.3) <sup>abc</sup>	801.8 (±13.9) <sup>a</sup>	781.7 (±17.6) <sup>ab</sup>	736.8 (±10.1) <sup>abc</sup>
Con F100	741.2 (±26.3) <sup>abc</sup>	697.8 (±17.5) <sup>bc</sup>	752.2 (±40.8) <sup>ab</sup>	671.1 (±34.9) <sup>c</sup>
<b>Síntesis de ABA <i>de novo</i> estimada</b>	<b>-2.6</b>	<b>104.0</b>	<b>29.5</b>	<b>65.7</b>
GE! Sin F100 (%)	20.0 (±8.7) <sup>c</sup>	35.0 (±5.0) <sup>bc</sup>	53.3 (±7.3) <sup>abc</sup>	20.0 (±5.0) <sup>c</sup>
GE! Con F100 (%)	98.3 (±1.7) <sup>a</sup>	95.0 (±2.9) <sup>a</sup>	86.7 (±3.3) <sup>ab</sup>	86.7 (±6.7) <sup>ab</sup>

#### 4.3.4. Germinación de estructuras que componen el fruto a cosecha. Experimento III.

La germinación de las distintas estructuras del fruto a cosecha mostró diferencias en relación a la FS y tratamiento de temperatura (Fig. 4.10). Los frutos del tratamiento control presentaron mayor germinación que los provenientes del tratamiento +T en ambas FS. Sin embargo, los embriones de las FS tempranas mostraron el comportamiento

contrario, mientras que los de la FS tardías presentaron un porcentaje de germinación cercano al 100% en ambos tratamientos.



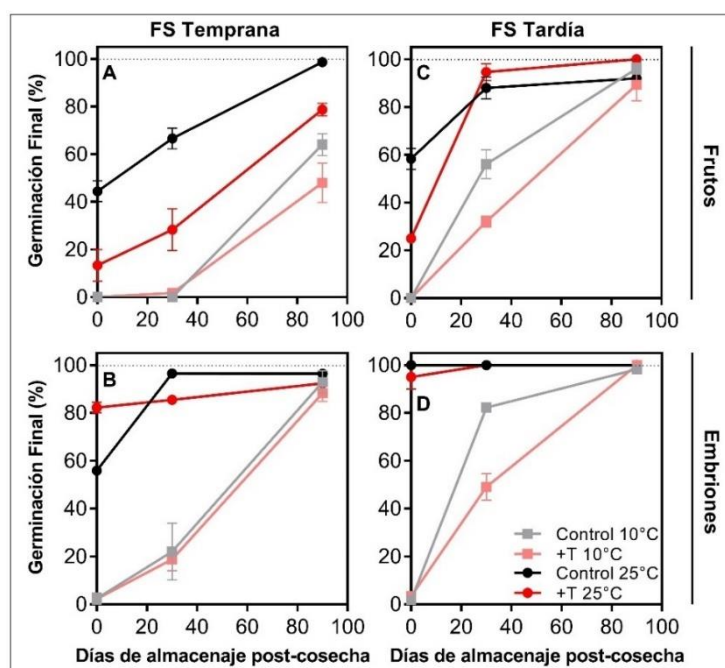
**Fig. 4. 10.** Porcentaje final de germinación de frutos y embriones a cosecha, incubados a 25°C, según FS y tratamiento térmico, del experimento III. Las barras llenas indican la FS temprana, mientras que las que contienen líneas diagonales, representan la FS tardía; las barras negras indican al tratamiento control y las rojas, al tratamiento +T. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por estructura evaluada) con letras diferentes, cuando la interacción entre FS y tratamiento térmico fue significativa, según el test de Kruskal–Wallis (frutos: p-valor=0.026; embriones: p-

#### 4.3.5. Germinación de estructuras que componen el fruto durante el almacenaje post-cosecha. Experimento III.

A medida que transcurrieron los días de almacenaje post-cosecha se observó un aumento de la germinación en frutos y embriones para todos los tratamientos y condiciones de incubación (Fig. 4.11). Sin embargo, los embriones siempre presentaron valores de germinación superiores o iguales a los frutos. A su vez, cuando la incubación se realizó a 10°C, se registró un menor porcentaje de germinación que a 25°C.

La FS y el tratamiento térmico provocaron diferencias en la germinación de ambas estructuras. En términos generales, frutos y embriones de FS tardías presentaron un mayor porcentaje de germinación que los provenientes de FS tempranas. En relación a los tratamientos térmicos, en líneas generales, tanto los frutos como embriones del tratamiento control presentaron un mayor porcentaje de germinación que los del

tratamiento +T (Fig. 4.11A); sin embargo, en los embriones de la FS temprana cuando fueron incubados a 25°C a cosecha se observó una mayor germinación del tratamiento +T en relación al control, tal como se comentó anteriormente (Fig. 4.10). Las diferencias entre tratamientos fueron más evidentes en frutos incubados a 25°C en FS tempranas. Es interesante remarcar que, en todos los casos, los embriones incubados a 10°C presentaron un porcentaje de germinación nulo a cosecha, lo que indicaría que esta estructura explica el nivel de dormición del fruto entero en esta condición.



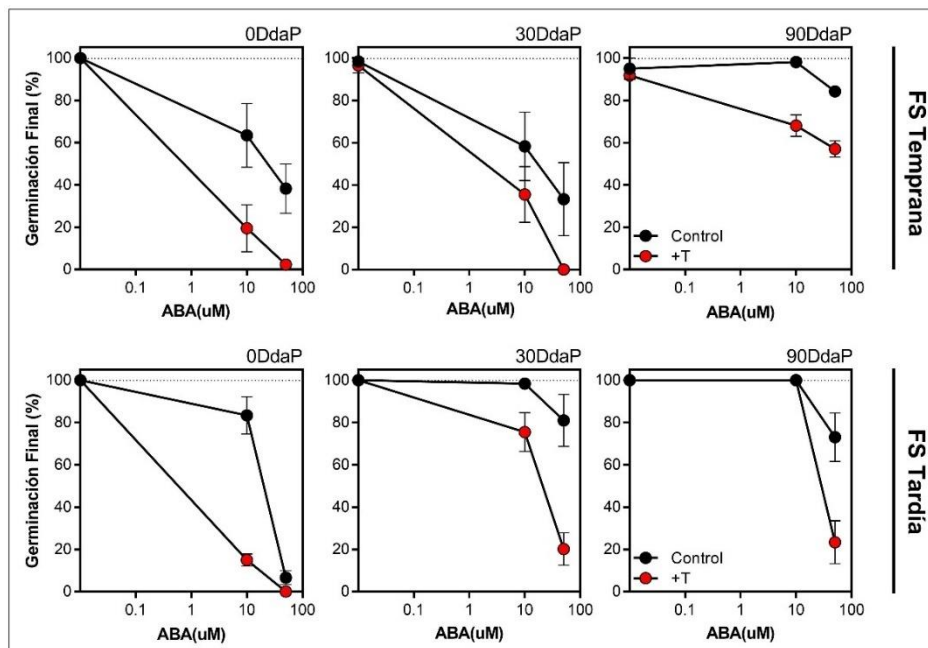
**Fig. 4. 11.** Porcentaje final de germinación de frutos (A y C) y embriones (B y D) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha, incubados en agua destilada, según FS y tratamiento térmico, del experimento III. Las líneas y puntos grises representan al tratamiento control incubado a 10°C, las líneas y puntos rosas, al tratamiento +T a 10°C, las negras, al tratamiento control a 25°C y las rojas, al +T a 25°C. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño

#### 4.3.6. Sensibilidad de embriones al de ABA durante el almacenaje post-cosecha.

##### Experimento III.

Como fue observado en el capítulo 3, generalmente embriones de FS tardías presentaron una menor sensibilidad al ABA que FS tempranas (Fig. 4.12). En relación al

tratamiento térmico, los embriones provenientes del tratamiento control presentaron una menor sensibilidad al efecto inhibitorio del ABA que los embriones del tratamiento +T.



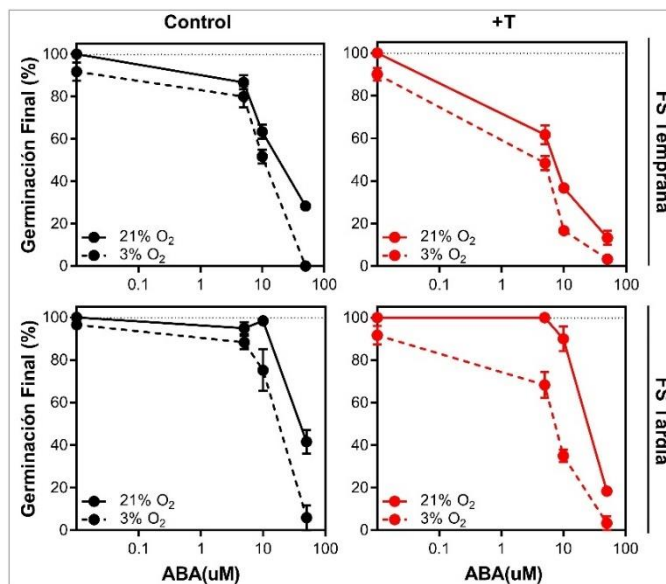
**Fig. 4. 12.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 25°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdaP), según FS y tratamiento térmico, del experimento III. Los puntos negros representan al tratamiento control y los rojos, al tratamiento +T. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como  $x=0$  están graficados como  $x=0.01$ , y representan a embriones incubados en F100.

#### 4.3.7. Sensibilidad de embriones al ABA durante el almacenaje post-cosecha en hipoxia.

##### Experimento III.

La hipoxia (3%O<sub>2</sub>) disminuyó significativamente la germinación en agua (Fig. 4.13) únicamente en los embriones pertenecientes al tratamiento FSTe-T (ver punto  $x=0.01$ ); sin embargo, aumentó la sensibilidad al ABA de los embriones en todos los tratamientos. En relación a los tratamientos térmicos, para ambas FS, los embriones del tratamiento +T aumentaron su sensibilidad al ABA en condiciones de hipoxia en mayor medida que en el tratamiento control. Por ejemplo, en ABA 5  $\mu$ M se registró una disminución en la germinación de embriones incubados a 3%O<sub>2</sub>, en términos porcentuales

y relativo al máximo obtenido en una atmósfera normal, de 7.7%, 21.6%, 7% y 31.7% para los tratamientos FSTe-C, FSTe-T, FSTa-C y FSTa-T, respectivamente. La misma tendencia se observó en ABA 10  $\mu\text{M}$ .



**Fig. 4. 13.** Porcentaje final de germinación de embriones de 40 días de almacenaje post-cosecha incubados a 25°C en condiciones crecientes de ABA, bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21%O<sub>2</sub> (líneas llenas) y 3%O<sub>2</sub> (líneas punteadas), según FS y tratamiento térmico, del experimento III. Líneas y puntos negros indican al tratamiento control, mientras que los rojos, al tratamiento +T. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados

#### 4.3.8. Caracterización del ambiente térmico. Experimento IV.

La transferencia de plantas en el momento de MF determinó que las mismas exploren diferentes temperaturas en el período R6-MC (Cuadro 4.3). Las provenientes del tratamiento +T y C+T exploraron mayores temperaturas medias diarias y medias diarias máximas que las plantas Control y +T-C luego de la transferencia. En cuanto a las temperaturas mínimas, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

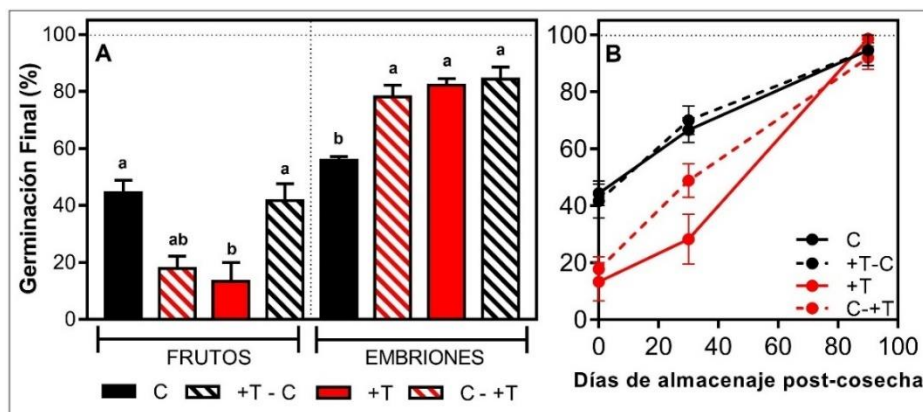
**Cuadro 4. 3.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables térmicas registradas desde R6-MC, antes (R6–MF) o después de la transferencia (MF–MC) de macetas, del experimento IV. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias de temperaturas ( $\alpha=0.05$ ). Antes de la transferencia: p-valor Temperatura media diaria (TMd) $<0.001$ ; p-valor Temperatura media diaria máxima (TMMxd) $<0.001$ ; p-valor Temperatura media diaria mínima (TMMnd)=0.153. Después de la transferencia: p-valor Temperatura media diaria $<0.001$ ; p-valor Temperatura media diaria máxima $<0.001$ ; p-valor Temperatura media diaria mínima=0.082). Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en  $^{\circ}$ C.

Tratamiento	TMd ( $^{\circ}$ C)	TMMxd ( $^{\circ}$ C)	TMMnd ( $^{\circ}$ C)
<i>Antes de la transferencia</i>			
Control	27.9 ( $\pm 1.4$ ) <sup>b</sup>	36.6 ( $\pm 2.8$ ) <sup>b</sup>	21.0 ( $\pm 2.2$ )
C→T	27.9 ( $\pm 1.4$ ) <sup>b</sup>	36.6 ( $\pm 2.8$ ) <sup>b</sup>	21.0 ( $\pm 2.2$ )
+T	30.5 ( $\pm 1.8$ ) <sup>a</sup>	42.2 ( $\pm 2.6$ ) <sup>a</sup>	22.3 ( $\pm 1.7$ )
+T–C	30.5 ( $\pm 1.8$ ) <sup>a</sup>	42.2 ( $\pm 2.6$ ) <sup>a</sup>	22.3 ( $\pm 1.7$ )
<i>Después de la transferencia</i>			
Control	25.2 ( $\pm 2.7$ ) <sup>b</sup>	33.3 ( $\pm 3.6$ ) <sup>b</sup>	18.9 ( $\pm 3.2$ )
C→T	28.7 ( $\pm 2.6$ ) <sup>a</sup>	40.6 ( $\pm 2.8$ ) <sup>a</sup>	20.6 ( $\pm 2.7$ )
+T	28.7 ( $\pm 2.6$ ) <sup>a</sup>	40.6 ( $\pm 3.9$ ) <sup>a</sup>	20.6 ( $\pm 2.7$ )
+T–C	25.2 ( $\pm 2.7$ ) <sup>b</sup>	33.3 ( $\pm 3.6$ ) <sup>b</sup>	18.9 ( $\pm 3.2$ )

#### 4.3.9. Germinación de estructuras que componen el fruto a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha. Experimento IV.

La germinación de las distintas estructuras del fruto mostró diferencias en relación al tratamiento térmico aplicado (Fig. 4.14). Los frutos de +T–C tuvieron un comportamiento similar al tratamiento Control a cosecha (Fig. 4.14A) y durante el almacenaje post-cosecha (Fig. 4.14B), presentando un mayor porcentaje de germinación (es decir, menor nivel de dormición). El tratamiento C→T presentó un comportamiento similar al +T, presentando un menor porcentaje de germinación. En relación a los embriones (Fig. 4.14A), los provenientes del tratamiento control presentaron un menor porcentaje de germinación a cosecha que el resto de los tratamientos. Estos últimos, no evidenciaron diferencias entre tratamientos, presentando porcentajes de germinación entre 80 y 90%.

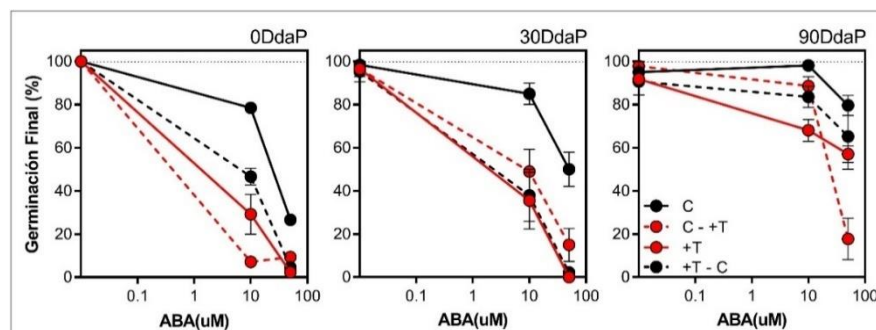




#### 4.3.10. Sensibilidad de embriones al ABA durante el almacenaje post-cosecha.

##### Experimento IV.

La sensibilidad al ABA de los embriones difirió entre tratamientos térmicos (Fig. 4.15). Los provenientes del tratamiento Control presentaron una menor sensibilidad al ABA que el tratamiento +T en los 3 momentos analizados. En relación a los tratamientos de transferencia de plantas se puede observar que en general presentan un comportamiento más parecido al tratamiento +T. Sin embargo, a los 0 y 90 días de almacenaje post-cosecha, los embriones del tratamiento donde se aumentó la temperatura hacia el final del



período de desarrollo del fruto (C→T) presentaron una sensibilidad mayor a aquellos expuesto a menores temperaturas durante este mismo período.

En este capítulo se observó que mayores temperaturas ambientales durante el desarrollo de los frutos aumentan su nivel de dormición primaria, tanto en FS tempranas como en FS tardías; aunque en las primeras el efecto fue mayor (Fig. 4.10; Fig. 4.11). Este aumento en el nivel de dormición se asoció a embriones en desarrollo con mayor contenido y capacidad de síntesis de ABA (Fig. 4.9; Cuadro 4.2). A la cosecha y durante el almacenaje post-cosecha, el nivel de dormición del fruto guardó relación con la sensibilidad de los embriones al ABA y embriones provenientes de los tratamientos de mayor temperatura durante su desarrollo resultaron más sensibles a la hormona en condiciones de O<sub>2</sub> atmosférico y de hipoxia (Fig. 4.12; Fig. 4.13). Esta regulación de la dormición del fruto por efecto del ambiente térmico tendría lugar en el período posterior a la MF de los frutos (Fig. 4.14; Fig. 4.15).

#### **4.4. Discusión**

Existen numerosas evidencias de que la temperatura que exploran las semillas y/o frutos durante su desarrollo en la planta madre afecta el nivel de dormición de las mismas a cosecha (Gutterman, 1980; Roach y Wulff, 1987; Fenner, 1991; Allen et al., 2007). Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que en el cultivo de girasol los ambientes de mayor temperatura, sobre todo hacia el final del período de desarrollo del fruto, determinan un mayor nivel de dormición de los frutos a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha. Los cambios en la capacidad de síntesis de ABA de los ejes embrionarios durante el desarrollo del fruto y la sensibilidad embrionaria al ABA durante el almacenaje post-cosecha descritos en el capítulo anterior parecerían ser, aquí también, los puntos

regulatorios de la respuesta germinativa de los frutos ante variaciones en el ambiente térmico.

Diversos trabajos han observado que los efectos del ambiente térmico que exploran las semillas durante su desarrollo sobre el nivel de dormición estarían asociados a cambios en el metabolismo y la señalización del ABA (Kucera et al., 2005; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En este capítulo, el contenido endógeno de ABA, la capacidad de síntesis de ABA de los embriones y la sensibilidad de los embriones al ABA durante el desarrollo difirió entre FS y tratamientos térmicos. En la FS temprana, mayores temperaturas determinaron mayores contenidos endógenos de ABA durante el desarrollo y a cosecha (Fig. 4.9A) y un mayor nivel de ABA durante la incubación en frutos inmaduros (25% de humedad) asociado a una mayor capacidad de síntesis de ABA (Cuadro 4.2). La promoción de la germinación de embriones en desarrollo por el agregado de F100 (Cuadro 4.2) sugiere que la síntesis de ABA sería uno de los mecanismos que estaría regulando la imposición y el mantenimiento de la dormición durante el desarrollo, tal como reportaron varios trabajos previos en girasol (Le Page-Degivry y Garello, 1992; Bianco et al., 1994; Le Page-Degivry et al., 1996). Una asociación entre los efectos del ambiente térmico sobre el nivel de dormición y la capacidad de síntesis de ABA también fue observada en trigo, donde embriones de cariopses con un mayor nivel de dormición por haber madurado en un ambiente más fresco presentaron una mayor capacidad de síntesis de ABA (Garello y Le Page-Degivry, 1999). Sin embargo, los embriones provenientes del tratamiento +T de la FS temprana que presentaban un mayor contenido de ABA y una mayor capacidad de síntesis (Cuadro 4.2) mostraron un porcentaje de germinación en agua mayor que los embriones provenientes del tratamiento control, tanto en desarrollo como a cosecha (Fig. 4.7, Fig. 4.10). Esto sugiere que el nivel de ABA y la capacidad de síntesis de la hormona en los embriones no estarían relacionados con la

capacidad germinativa en agua de los mismos. Algo similar se observó en el capítulo 3, donde los embriones del genotipo 1552 de FS tempranas, con mayor contenido y capacidad de síntesis de ABA en la incubación, presentaron mayor germinación en agua hacia el final del desarrollo y a cosecha (Cuadro 3.2, Fig. 3.3A, Fig. 3.3B, Fig. 3.3C, Fig. 3.5A, Fig. 3.5B, Fig. 3.8A, Fig. 3.8B, Fig. 3.8C). Existen evidencias contrapuestas en varias especies en relación a la posible asociación entre el nivel endógeno de ABA y los cambios en el nivel de dormición como resultado de variaciones en el ambiente térmico durante el desarrollo de las semillas y/o frutos. En especies como lechuga y trigo variaciones en el nivel de dormición de los frutos, como resultado de modificaciones en el ambiente térmico durante su desarrollo, no mostraron una asociación con el contenido de ABA de los embriones (Walker-Simmons, 1988; Contreras et al., 2009). Sin embargo, en *Arabidopsis* y en *Brassica oleracea*, semillas que tenían alto nivel de dormición por haber sido producidas a bajas temperaturas presentaron un mayor nivel de ABA y un menor nivel de GA4 en comparación con aquellas producidas a mayores temperaturas (Kendall et al., 2011; Chen et al., 2021). Estas variaciones se explicaron por una mayor expresión de *NCED* (síntesis de ABA) y de *GA2ox6* (degradación de GAs) y una menor expresión de *CYP707A2* (degradación de ABA).

En las FS tardías el mayor porcentaje de germinación de los embriones en desarrollo del tratamiento control (Fig. 4.7) se asoció a una menor síntesis de ABA *de novo* en desarrollo (Cuadro 4.2). Sin embargo, en esta FS no se observaron diferencias significativas en el nivel endógeno de ABA durante el desarrollo (Fig. 4.9B), ni en la germinación de los embriones incubados en GAs y etileno (Fig. 4.7, Fig. S4.1) entre tratamientos térmicos. Las diferencias de respuesta observadas entre FS podrían estar explicadas por diferencias en los rangos térmicos explorados en ambas FS (mayores temperaturas en FS tempranas; Cuadro 4.1) o por la interacción con otros factores que

varían con la FS, como el nivel de radiación incidente (menores en FS tardías; Cuadro 3.1, Cuadro S3.1).

Más allá de las diferencias observadas en el contenido endógeno de ABA entre FS y tratamientos térmicos, en ambas FS la mayor dormición de los frutos expuestos a altas temperaturas se asoció a una mayor capacidad de síntesis de ABA de los embriones durante las últimas etapas del desarrollo y a una mayor sensibilidad al ABA de los mismos durante la post-cosecha (Cuadro 4.2, Fig. 4.8, Fig. 4.10, Fig. 4.11, Fig. 4.12). Estos resultados sugieren que el ambiente térmico durante el desarrollo podría modular la sensibilidad al ABA de los embriones como resultado de una mayor capacidad de síntesis de ABA en algún momento hacia el final del desarrollo (Le Page-Degivry et al., 1996), tal como se propuso en el capítulo 3. Esta mayor sensibilidad al ABA de los embriones que prevalece hacia la cosecha del cultivo y durante el almacenaje post-cosecha es lo que determina el mayor nivel de dormición de los frutos. Esta hipótesis también estaría apoyada por la asociación existente entre el menor nivel de dormición de los frutos a cosecha, la menor sensibilidad al ABA y la menor capacidad de síntesis de ABA de los embriones del tratamiento de “alta” temperatura de la FS tardía en relación al mismo tratamiento en la FS temprana (Cuadro 4.2, Fig. 4.8, Fig. 4.10).

En la mayoría de las especies estudiadas se ha observado que aumentos en la temperatura media diaria durante el llenado se asociaron a disminuciones en el nivel de dormición de las semillas maduras o recién dispersadas (Walker-Simmons y Sessing, 1990; Sung et al., 1998; Garelo y Le Page-Degivry, 1999; Steadman et al., 2004; Sung et al., 2008; Contreras et al., 2009; Kendall et al., 2011; He et al., 2014; Barrero et al., 2020; Chen et al., 2021). Sin embargo, en girasol este comportamiento es particularmente cierto para los embriones, pero no para los frutos (Fig. 4.10, Fig. 4.11, Fig. 4.14). Frutos expuestos a mayores temperaturas durante el llenado presentaron una menor dormición

embrionaria pero una mayor dormición impuesta por las cubiertas a cosecha. Esta respuesta se observó claramente cuando los cultivos fueron sembrados en primavera y en aquellos tratamientos del experimento IV que en algún momento del desarrollo fueron expuestos a altas temperaturas, mientras que en la FS tardía de verano los embriones germinaron 100% en ambos tratamientos (Fig. 4.10, Fig. 4.14). Una respuesta similar fue observada por Bodrone et al. (2017) en un material híbrido de girasol y en quinoa por Ceccato et al. (2011). Esto sugiere, tal como indicamos en el capítulo 3, que las cubiertas (pericarpo + cubierta seminal) contribuyen a la dormición del fruto entero en los tratamientos de alta temperatura, e interactúan con el embrión aumentando su sensibilidad al ABA (Domínguez et al., 2019). En este sentido, a pesar de que los embriones aislados de FSTe-T germinen más en agua (Fig. 4.10) son más sensibles al ABA (Fig. 4.12), determinando que los frutos de este tratamiento presenten un mayor nivel de dormición, como fue observado preliminarmente por Bodrone et al. (2017). La sensibilidad de los embriones al ABA sería el mecanismo que modula el nivel de dormición del fruto entero durante la post-maduración en seco en frutos de girasol (Le Page-Degivry et al., 1996; Rodríguez et al., 2018). Respuestas similares al ambiente térmico materno se reportaron en frutos de lechuga y trigo (Walker-Simmons y Sessing, 1990; Biddulph et al., 2007; Contreras et al., 2009). Los resultados obtenidos nos permiten corroborar que en girasol las mayores temperaturas durante el desarrollo de los frutos aumentan el nivel de dormición de los mismos a través de una modulación de la sensibilidad al ABA de los embriones.

Las cubiertas que recubren al embrión pueden imponer dormición a través de la interferencia con el intercambio gaseoso (por ejemplo, entrada de O<sub>2</sub>; Corbineau y Côme, 1995; Rolletschek et al., 2007; Borisjuk y Rolletschek, 2009). Esta condición de hipoxia aumentaría la sensibilidad al ABA de los embriones (Benech-Arnold et al., 2006;

Domínguez et al., 2019) como se observó en embriones provenientes de FS tempranas en el capítulo 3 (Fig. 3.14). En este capítulo, los embriones expuestos a mayores temperaturas durante el desarrollo presentaron un mayor aumento en su sensibilidad al ABA en respuesta a la hipoxia que aquellos del tratamiento control (Fig. 4.13). Esta respuesta fue más notoria en las FS tardías, probablemente porque los embriones de FS tempranas presentaron un nivel de dormición más alto al momento del muestreo (40 días de almacenaje post-cosecha). Entonces, el AM térmico también regularía el nivel de dormición del fruto a través de la modulación de la sensibilidad de los embriones a la hipoxia. En este ensayo no se realizaron determinaciones de cambios en las propiedades anatómicas de las cubiertas, como en el capítulo anterior. Sin embargo, sería importante verificar estos efectos en futuros ensayos, ya que estos cambios podrían afectar el nivel de hipoxia al que está sometido el embrión y el nivel de dormición del fruto. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se ha observado que el nivel de hipoxia impuesto por las cubiertas se encuentra modulado por el AM a través de una deposición diferencial de suberina (Fedi et al., 2017). Dicha suberización es promovida por el ABA (Barberon et al., 2016) que está presente en mayores concentraciones en las semillas que presentan mayor dormición por haber sido desarrolladas a bajas temperaturas (Kendall et al., 2011).

En algunas especies se ha observado que la regulación del nivel de dormición de los frutos por el ambiente térmico explorado durante su desarrollo tendría lugar en las etapas finales de este período. Por ejemplo, en cebada, las temperaturas experimentadas por las semillas hacia fines del llenado (entre 300–350°Cd desde el inicio del llenado) fueron las que presentaron mayor correlación con el nivel de dormición observado a cosecha (Rodríguez et al., 2001; Gualano y Benech-Arnold, 2009). En trigo, resultados reportados por Biddulph et al. (2007) y Barrero et al. (2020), mostraron que las temperaturas hacia la mitad y final del llenado (específicamente 40–50 días desde

polinización), respectivamente, son las que modulan el nivel de dormición de las semillas. Sin embargo, en otras especies como lechuga, los efectos de la temperatura sobre la germinabilidad de la semilla se produjeron durante la primera fase del desarrollo de la semilla, es decir, durante la etapa de división celular e histo-diferenciación (Contreras et al., 2009). Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que es durante las etapas finales del desarrollo del fruto (entre MF y MC, experimento IV) donde el aumento de la temperatura (Cuadro 4.3) estaría modulando el nivel de dormición de los frutos a cosecha (Fig. 4.14, Cuadro S2.6). Resultados similares fueron encontrados por Bodrone (2014), donde mayores temperaturas hacia el final del llenado del fruto de girasol (específicamente a partir de los 454°Cd desde antesis,  $T_b=6^{\circ}\text{C}$ ) provocaron el mayor nivel de dormición de los mismos. En este sentido, se observó una asociación entre mayores temperaturas hacia el final del llenado, mayor nivel de dormición del fruto y mayor sensibilidad al ABA del embrión (Cuadro 4.3, Fig. 4.14, Fig. 4.15). Estos resultados sugieren que la sensibilidad al ABA de los embriones se determinaría en las etapas finales del desarrollo del fruto, cuando una vez alcanzada la MF el fruto sólo pierde agua hasta alcanzar la MC. La importancia de conocer el momento en que el ambiente térmico determina el nivel de dormición a cosecha de los frutos de girasol es relevante para pronosticar el nivel de dormición del fruto cosechado, y para seleccionar y comparar la dormición entre genotipos que difieran en el posicionamiento de las etapas finales del desarrollo de la semilla a un determinado ambiente.

En este capítulo mostramos que mayores temperaturas ambientales durante el desarrollo de los frutos aumentan el nivel de dormición de los frutos. Este comportamiento se asoció a una mayor contribución de las cubiertas a la dormición del fruto entero, embriones más sensibles al ABA y a un mayor aumento de la sensibilidad de los embriones al ABA bajo condiciones de hipoxia. En este sentido, y tal como se



sugirió en el capítulo 3, esta mayor respuesta al ABA exógeno podría estar determinada por la mayor capacidad de síntesis de ABA que mostraron los embriones en desarrollo cuando provinieron de ambientes más cálidos. Asimismo, se observó que las diferencias en el nivel de dormición del fruto entre tratamientos térmicos fueron más evidentes en las FS de primavera, y que el período posterior a la MF de los frutos sería el momento en el cual se define el nivel de dormición a cosecha. Los resultados provistos en este capítulo sugieren que el mayor nivel de dormición producto de FS tempranas reportados en el capítulo 3, así como los mecanismos involucrados (metabolismo y sensibilidad al ABA) en esta regulación, estarían determinados, al menos en parte, por una mayor temperatura explorada por los frutos durante su desarrollo en esta FS.

## **CAPÍTULO 5. Efecto de manipulaciones en la relación fuente destino durante la etapa de desarrollo del fruto en la planta madre sobre el nivel de dormición en frutos de girasol**

### **5.1. Introducción**

En los capítulos anteriores (2 y 3), se evaluó el efecto de variaciones en la FS sobre el nivel de dormición y los mecanismos fisiológicos asociados. Los resultados obtenidos mostraron claramente que atrasos en la FS determinan una disminución del nivel de dormición de los frutos. En FS tardías, los frutos están expuestos no solo a ambientes caracterizados por menores temperaturas y fotoperiodos más cortos, sino también a menores niveles de radiación incidente. En relación a este factor, se han reportado efectos de una menor radiación incidente durante el desarrollo de las semillas en su posterior germinación (Sánchez et al., 1981; Sultan, 1996; Gallagher et al., 2013; Chen et al., 2020). Por ejemplo, en el caso de girasol, Pizzorno (2021) reportó que una restricción en el nivel de radiación incidente de 80% sobre las hojas del cultivo durante el período de desarrollo de los frutos determinó una disminución de la dormición impuesta por las cubiertas, asociada a cambios en el espesor de las mismas. Sin embargo, no se observaron efectos sobre la dormición embrionaria, ya que los embriones aislados provenientes de los tratamientos sombreo y control germinaron cerca del 100%. Estos resultados, sugieren la posibilidad de que los cambios en el nivel de dormición asociados a atrasos en la FS reportados en los capítulos 2 y 3 de esta tesis, estén, al menos en parte, determinados por cambios en la relación FD, ya que el menor nivel de radiación y temperatura a los que están expuestas las plantas de girasol en FS tardías determinan menores tasas de crecimiento de las plantas durante el periodo de desarrollo de los frutos. En este sentido existen evidencias que indican que variaciones en la FD producidas mediante sombreo, defoliaciones y/o variaciones en la densidad de siembra, pueden afectar el nivel de dormición o la capacidad

germinativa de las semillas (Maun y Cavers, 1971; Frascaroli et al., 2005). Específicamente en un trabajo realizado en girasol, donde se manipuló la relación FD con el objetivo de evaluar diferencias en la capacidad germinativa entre semillas de distintos tamaños, se observó que semillas más grandes, generadas mediante tratamientos de remoción de semillas en el capítulo y menores densidades de siembra, presentaron un menor porcentaje de germinación y menor velocidad promedio de germinación que las semillas pequeñas cuando fueron incubadas a 15°C (Saranga et al., 1998). Más allá de estas evidencias, existe escasa información en relación a los posibles efectos de cambios en la fuente o en los destinos durante el desarrollo de los frutos sobre el nivel de dormición a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha en el cultivo de girasol. A su vez, se desconoce si estos cambios podrían afectar en forma diferencial los distintos componentes que hacen a la dormición del fruto (pericarpo y embrión), y cuál sería la relación existente entre estos cambios y los mecanismos responsables de la imposición de la dormición en los frutos de girasol. De hecho, los mecanismos hormonales relacionados al ABA aún no se han explorado en este tipo de experimentos. Aunque los antecedentes relacionados a esta temática son escasos, las evidencias disponibles sugieren que semillas provenientes de plantas sometidas a distintos estreses post-antesis, que tienden a disminuir la relación FD, presentaron menor sensibilidad al ABA (Benech-Arnold et al., 1991; Benech-Arnold et al., 1995) y menor contenido de ABA a cosecha, tanto en seco como durante la incubación (Sánchez et al., 1981; Chen et al., 2020, Pizzorno, 2021).

En el presente capítulo se estudió cómo cambios en la relación FD determinados mediante defoliaciones, remoción de frutos y variaciones en la densidad de siembra afectan: (i) el nivel de dormición de los frutos durante el desarrollo, a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha, (ii) la contribución de las cubiertas del fruto y del embrión a la dormición del fruto entero, (iii) las propiedades anatómicas de las cubiertas del fruto y (iv)

el contenido endógeno de ABA, la sensibilidad de los embriones al ABA y la influencia de la hipoxia sobre este último mecanismo.

## **5.2. Materiales y Métodos**

### 5.2.1. Sitio de los ensayos y material vegetal.

Los experimentos se realizaron en el campo experimental de la cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34°25' S, 58°25' O). Los genotipos utilizados fueron el 1552 y 1579 (*ver características de los genotipos en Cuadro 2.1 del capítulo 2*). En la campaña 2017/2018, el genotipo 1552 (experimento 1: E1) fue evaluado mediante los siguientes tratamientos: Defoliado, Sombreo y Desgranado, mientras que el genotipo 1579 (experimento 2: E2) fue sujeto a los siguientes tratamientos: Defoliado y Desgranado. En la campaña 2018/2019 solo se evaluó el genotipo 1579 (experimento 3: E3). Se llevaron a cabo tratamientos de Defoliado y Desgranado, y experimentos de variación en la densidad de siembra y raleo de plantas (experimento 4: E4). El detalle de los tratamientos de FD y de Densidad–Raleo aplicados se describen a continuación.

### 5.2.2. Tratamientos y condiciones generales de los ensayos a campo.

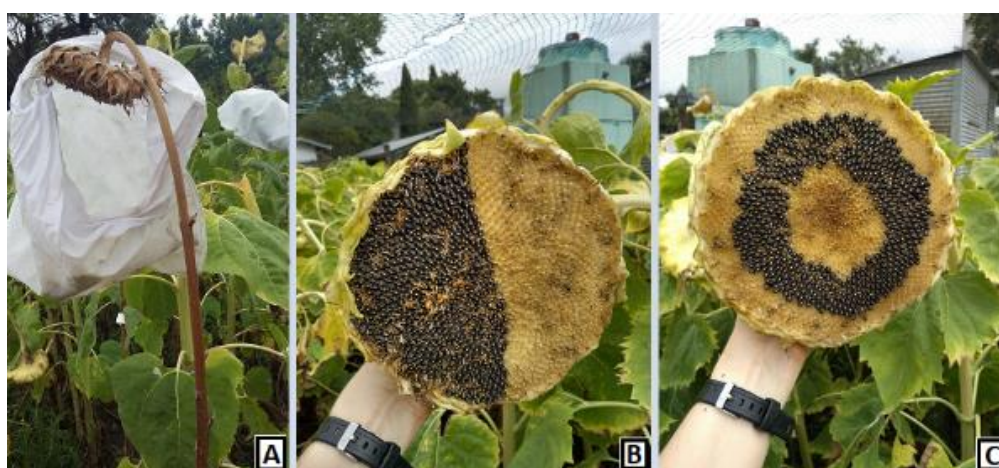
El diseño de los experimentos fue completamente aleatorizado con 3 repeticiones. Sin embargo, difirió de acuerdo se tratase de los experimentos de FD o de Densidad–Raleo.

#### 5.2.2.1. Variaciones en la relación FD (E1, E2 y E3).

Se sembraron parcelas de 20m x 20m con una densidad de 5 plantas m<sup>-2</sup> y una distancia entre plantas de 0.52m. En R4 (Schneiter y Miller, 1981) las plantas fueron cubiertas con bolsas de poliamida, para evitar que al momento de antesis ocurra el intercambio de polen entre los distintos genotipos. Las plantas se polinizaron manualmente

dos veces al día durante el período de antesis. En R5.1 se registraron datos de altura de planta al capítulo y diámetro del capítulo. Estos registros fueron utilizados como criterio para seleccionar plantas con atributos homogéneos para los experimentos de FD. Para los tratamientos de FD solo se utilizaron plantas que no difirieron en más de dos días en su fecha de antesis (R5.5).

En R6, cuando la antesis se completó en todas las flores del capítulo se procedió a aplicar aleatoriamente los tratamientos de FD a las plantas seleccionadas. Este momento fue elegido de modo de afectar en forma efectiva el tamaño y peso potencial del fruto, garantizando el cuaje de los frutos del tercio medio del capítulo (Rondanini et al., 2009; Lindström et al., 2015). Los tratamientos de FD fueron los siguientes: (i) defoliación del 100% de las hojas (*Defoliado* – Baja relación FD; Fig. 5.1A), (ii) remoción de frutos del capítulo (*Desgranado* – Alta relación FD; Fig. 5.1B, 5.1C), (iii) disminución del 80% de la radiación incidente sobre el canopeo (*Sombreo* – Baja relación FD, únicamente en E1[1552]); y (iv) tratamiento *Control* (tratamiento testigo). Cada tratamiento estuvo compuesto por 90 o 60 plantas, según el año y el genotipo, que fueron divididas en 3 grupos (3 repeticiones).



**Fig. 5. 1.** Fotos del tratamiento Defoliado. A) Cercano a cosecha. Desgranado. B) Remoción del 50% de los frutos; C) Remoción de los frutos de los tercios periférico e interior.

El tratamiento Sombreo (sólo en E1, genotipo 1552) se ejecutó mediante la instalación de carpas que consistieron en estructuras rectangulares construidas con listones de hierro (2 m de largo, 1 m de ancho y 1.5 m de altura) cubiertas con una media sombra negra de PVC, que permitía el paso del 20% de la radiación incidente. El sombreado fue impuesto sobre el canopeo, dejando fuera de la media sombra al capítulo. Este procedimiento se realizó para evitar que la menor temperatura ejercida por el sombreado (Cuadro S5.1) afecte la dinámica de llenado y secado de los frutos, además del nivel de dormición (Bodrone et al., 2017, capítulo 4). Además, resultados de experimentos realizados por Pizzorno (2021) mostraron que los efectos son similares si se somborean las hojas o la planta entera. El registro de temperatura dentro de la estructura de la media sombra fue realizado con un sensor portátil en forma horaria (DAT-10, Datalogger de temperatura, Schwyz, China). Las estructuras de sombreado permanecieron colocadas sobre las plantas hasta el momento de cosecha. Por su parte, el tratamiento Desgranado fue realizado de dos formas diferentes, de acuerdo a los experimentos. En el E1 (1552) y E2 (1579), la remoción de los frutos se realizó sobre la mitad del capítulo (Fig. 5.1B), dejando el 50% de los frutos. En el E3 (1579), se retiraron los frutos del tercio periférico e interior del capítulo, quedando únicamente los del tercio medio (Fig. 5.1C). En este caso la remoción fue del 66.7% de los frutos. En ambos tratamientos se tomó la precaución de que los frutos utilizados tanto para el seguimiento del peso y pérdida de humedad, como para los ensayos de germinación, no se encuentren inmediatamente al lado del sitio donde no hay frutos vecinos. Más allá de que la distribución de los tratamientos fue al azar, para evitar posibles efectos de los tratamientos aplicados sobre el ambiente percibido por plantas vecinas tratadas, cada planta tratada estuvo rodeada por plantas sin tratar.

#### 5.2.2.2. Densidad–Raleo (E4).

El diseño experimental de este experimento fue completamente al azar, con tres repeticiones (3 parcelas por tratamiento). Los tratamientos fueron: (i) *Alta densidad "AD"* (7 plantas m<sup>-2</sup>, Baja Relación FD), (ii) *Baja Densidad "BD"* (3.5 plantas m<sup>-2</sup>, Alta relación FD), (iii) *Raleo de planta entera "Raleo"* (de 7 plantas m<sup>-2</sup> a 3.5 plantas m<sup>-2</sup>, relación FD media). El tratamiento Raleo se realizó en R6 con la idea de afectar el peso de los frutos, sin afectar el número final. El mismo procedimiento que el expuesto en la descripción de los ensayos de FD se realizó en cada una de las parcelas: monitoreo de fenología desde R4, polinización manual diaria y selección de plantas según fecha de antesis. Se cosecharon 15 plantas por parcela para los ensayos de germinación.

#### 5.2.2.3. Características generales de los ensayos a campo.

En todos los tratamientos se determinó la dinámica del peso fresco y seco del fruto desde aproximadamente diez días desde antesis (cercano al momento de imposición de los tratamientos) hasta la MC (11% de humedad; *sección 2.2.2.* del capítulo 2). En MC, los capítulos se cortaron y trillaron manualmente. Sólo se seleccionaron para los ensayos los frutos provenientes del tercio medio de los capítulos. El secado de los frutos luego de la cosecha se realizó según la metodología explicada en la *sección 2.2.2.* (capítulo 2). Cuando los frutos alcanzaron aproximadamente 6% se limpiaron y fueron almacenados en bolsas de plástico herméticas en una atmósfera seca a 25°C. Las plantas se fertilizaron con fósforo a la siembra y con nitrógeno en V4, y se regaron mediante un sistema de riego por goteo. Se aplicaron fungicidas e insecticidas para mantener la sanidad. Los datos meteorológicos fueron registrados por una estación meteorológica ubicada en el sitio experimental (Davis Vantage Pro2).

#### 5.2.3. Ensayos de germinación.

##### 5.2.3.1. Momentos de muestreo.

Se realizaron muestreos de frutos durante la etapa de desarrollo de los frutos (40% de humedad de los frutos), a cosecha (luego del secado a 6%) y a intervalos regulares de aproximadamente 30-60 días durante el almacenaje post-cosecha, según experimento. El muestreo durante el desarrollo de los frutos fue realizado cuando los frutos presentaron 40% de humedad y se llevó a cabo sólo en los E1 (1552) y E3 (1579).

#### 5.2.3.2. Características de los ensayos de germinación.

Se colocaron 25 frutos (frutos intactos), 25 semillas (sin el pericarpo) y 25 embriones (sin pericarpo ni cubierta seminal) en placas de Petri de 9 cm de diámetro (n=3) sobre dos discos de papel de filtro humedecidos con 5 ml de agua destilada o con soluciones de distintas concentraciones de hormonas (ABA, GAs y etileno en forma de etefón) según corresponda. En las soluciones de ABA se incluyó al inhibidor de síntesis F100, para prevenir cambios en el contenido endógeno de ABA de los embriones (debido a la síntesis) durante la incubación en concentraciones fijas de ABA. Las cajas con las distintas estructuras se incubaron a temperaturas constantes de 10 y 25°C por 15 días. La remoción del pericarpo y cubierta seminal, el criterio de germinación y la frecuencia de recuento de germinación se llevaron a cabo tal como se explicó en la *sección 2.2.3* del capítulo 2.

#### 5.2.4. Determinación del contenido endógeno en seco y durante la incubación durante el desarrollo de los frutos.

Con el objetivo de determinar la dinámica del contenido de ABA de los embriones durante el desarrollo, se tomaron muestras de frutos hacia el final de su etapa de desarrollo en la planta madre. Se extrajeron los embriones y, seguidamente, se separó el eje embrionario del cotiledón, descartando el último. Los ejes embrionarios fueron congelados en nitrógeno líquido, liofilizados, pesados y molidos para la extracción acuosa



de ABA. La cuantificación de los extractos de ABA se realizó según la metodología explicada en la *sección 3.2.4.*, capítulo 3 y los datos se expresaron en  $\text{pg ABA mg PS}^{-1}$  de la muestra original. A su vez, frutos con 40% de humedad fueron incubados en agua y en F100 y se estimó el contenido de ABA de los ejes embrionarios a las 24 y 48 horas de incubación. La germinación de estos frutos y embriones también fue evaluada. Esta determinación se realizó sólo en E3 (1579).

#### 5.2.5. Determinación de la anatomía del pericarpo y velocidad de entrada de agua en frutos y semillas.

Al momento de la cosecha, frutos de cada tratamiento FD fueron fijados en FAA durante 48 horas. Luego se determinó el espesor y la anatomía del pericarpo mediante la metodología descrita en la *sección 3.2.5* del capítulo 3. Además, frutos y semillas de plantas expuestas a diferentes tratamientos de FD fueron incubados a 25°C a los 30 días de almacenaje post-cosecha para determinar la dinámica de imbibición hasta el inicio de la germinación. Ambas determinaciones se realizaron en el E3 (1579).

#### 5.2.6. Sensibilidad a la hipoxia y su efecto sobre la sensibilidad de los embriones al ABA.

Triplicados de 20 frutos, semillas o embriones, según corresponda, fueron dispuestos en bandejas plásticas sobre un papel de filtro colocado sobre una capa de algodón hidratada con 50ml de agua destilada o distintas soluciones de ABA y fueron incubados a 21% (atmósfera normal) y 3% de  $\text{O}_2$  por un período de 7 días. La concentración de hipoxia (3%  $\text{O}_2$ ) se generó en una cámara plástica hermética (ver *sección 3.2.6* del capítulo 3). Los ensayos fueron realizados utilizando frutos y semillas de los E1 (1552) y E2 (1579) que se incubaron en agua, y embriones del E3 (1579) que se incubaron en soluciones con distinta concentración de ABA (0 [agua destilada], 1, 5, 10 y 50  $\mu\text{M}$ ).

### 5.2.7. Potencial de crecimiento del embrión.

Veinte embriones se incubaron en una solución de PEG6000 (n=3) equivalente a un potencial osmótico de -1.5MPa (según la ecuación determinada por Michel, 1983). La solución de PEG fue renovada diariamente con el fin de evitar variaciones en el potencial osmótico del medio de incubación. Se realizaron conteos diarios de germinación, hasta alcanzar un claro plateau. Para este ensayo se utilizaron embriones del E3 (1579) provenientes de los tratamientos de FD luego de 40 días de almacenaje post-cosecha.

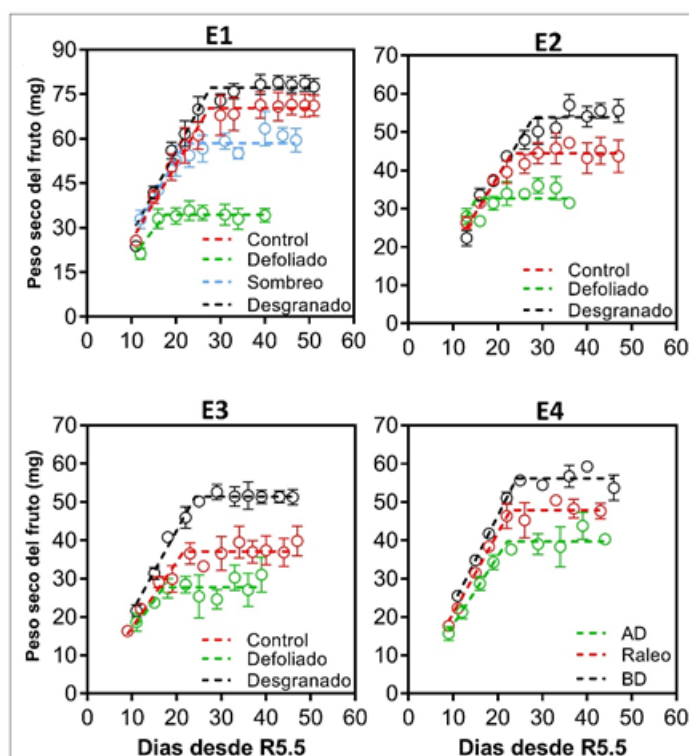
### 5.2.8. Análisis estadísticos.

La caracterización del ambiente, del llenado de los frutos (tasa y duración del llenado), de contenido de ABA y de espesor de pericarpo en los diferentes tratamientos de FD se analizaron mediante un análisis de varianza y posterior test de Tukey para la separación de medias con un nivel de significancia del 5%. La evolución del peso seco del fruto se ajustó al modelo explicado en la *sección 2.2.4* del capítulo 2, mientras que los datos de humedad del fruto se ajustaron a ecuaciones lineales. Se presentan los valores medios y los EE de la germinación final (luego de los 15 días de incubación). En los casos donde se requirió hacer inferencia estadística en los datos de germinación, se llevaron a cabo análisis no paramétricos (Kruskal–Wallis), con un nivel de significancia del 5%, ya que los registros de germinación no se distribuyen normalmente. Los softwares utilizados fueron Infostat (Di Rienzo et al., 2012) y GraphPad Prism 7 (Motulsky, 2003).

## **5.3. Resultados**

### 5.3.1. Caracterización del ambiente de llenado y del peso del fruto.

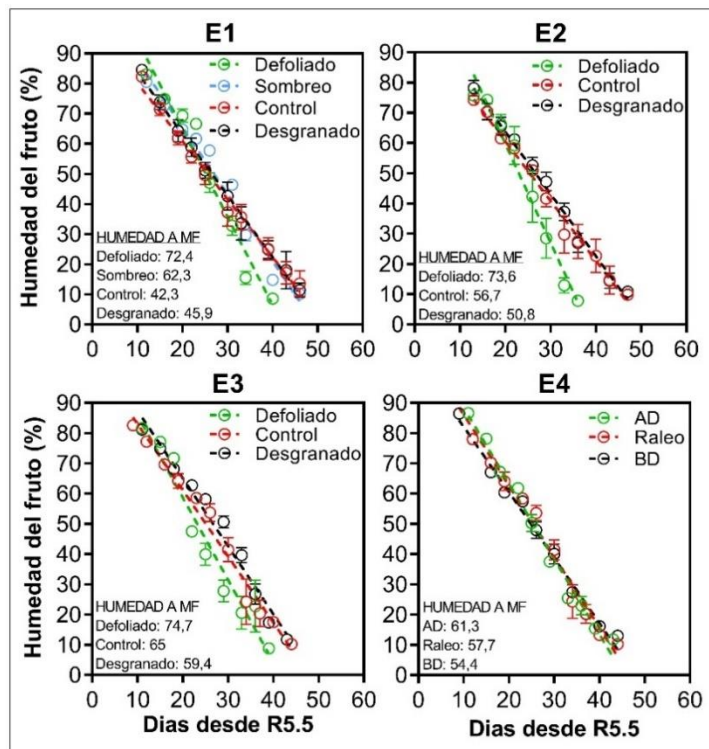
El peso seco final de los frutos difirió significativamente ( $p$ -valor $<0.05$ ) entre tratamientos (Fig. 5.2, Cuadro S5.2). Los mayores pesos se registraron para el tratamiento Desgranado, seguido del Control y, por último, el Defoliado (Cuadro S5.2). En el caso del E1 (1552), el peso seco de los frutos del Sombreo fue menor al Control y mayor al Defoliado (Cuadro S5.2). Por su parte, en el E4 (1579) el BD presentó mayor peso que el Raleo y este, mayor peso que el AD (Cuadro S5.2). El menor peso de los tratamientos Defoliado y Sombreo en relación al Control se explicó por una menor duración del llenado ( $p$ -valor $<0.05$ ) sin observarse cambios significativos en la tasa de llenado. El Desgranado no presentó diferencias significativas en la tasa ni en la duración del llenado con respecto al Control, pero los valores absolutos de ambos componentes del fruto



**Fig. 5. 2.** Evolución del peso seco unitario del fruto (mg) en función de los días desde antesis (R5.5) para los distintos experimentos y tratamientos de FD. Las líneas rojas representan los tratamientos Control y Raleo; las líneas verdes los tratamientos Defoliado y AD; las líneas negras, los tratamientos Desgranado y BD, y las azules, el tratamiento Sombreo. Los puntos representan datos promedio del peso seco ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Las fechas de cosecha para cada experimento y tratamiento fueron: E1(1552): Control: 7/2/2018; Defoliado: 26/1/2018; Sombreo: 2/2/2018; Desgranado: 7/2/2018; E2(1579): Control: 20/2/2018; Defoliado: 8/2/2018; Desgranado: 20/2/2018; E3(1579): Control: 10/2/2019; Defoliado: 31/1/2019; Desgranado: 10/2/2019; E4(1579): para los tres tratamientos, la cosecha se realizó el 9/3/2019.

fueron superiores (Cuadro S5.2). Finalmente, en los tratamientos de Densidad–Raleo, las diferencias en el peso de los frutos fueron explicadas por variaciones en la tasa de llenado, y no en la duración (Cuadro S5.2).

En cuanto a la pérdida de humedad de los frutos (Fig. 5.3), en todos los experimentos, el tratamiento Defoliado (y el Sombreo en E1[1552]) perdió humedad a mayor velocidad que los otros tratamientos (Cuadro S5.3). Esto determinó que alcanzase la humedad de cosecha en forma anticipada (Fig. S5.1). Asimismo, el mayor valor de humedad de los frutos de este tratamiento a MF (Fig. 5.3) sugiere que la defoliación completa de las hojas en R6 determinó la finalización anticipada del llenado de los frutos. El tratamiento Desgranado presentó una tasa de secado similar al tratamiento Control (Cuadro S5.3); sin embargo, el menor porcentaje de humedad registrado a MF en los experimentos E2 (1579) y E3 (1579) para este tratamiento estarían indicando que la



**Fig. 5. 3.** Evolución de la humedad del fruto (%) en función de los días desde antesis (R5.5) para los para los experimentos de FD. Las líneas rojas representan los tratamientos Control y Raleo las líneas verdes los tratamientos Defoliado y AD; las líneas negras, los tratamientos Desgranado y BD; y las azules, el tratamiento Sombreo. Los puntos representan datos promedio de humedad del fruto ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. En cada uno de los experimentos, se muestran los valores promedio de humedad del fruto cuando el mismo alcanzó la MF.

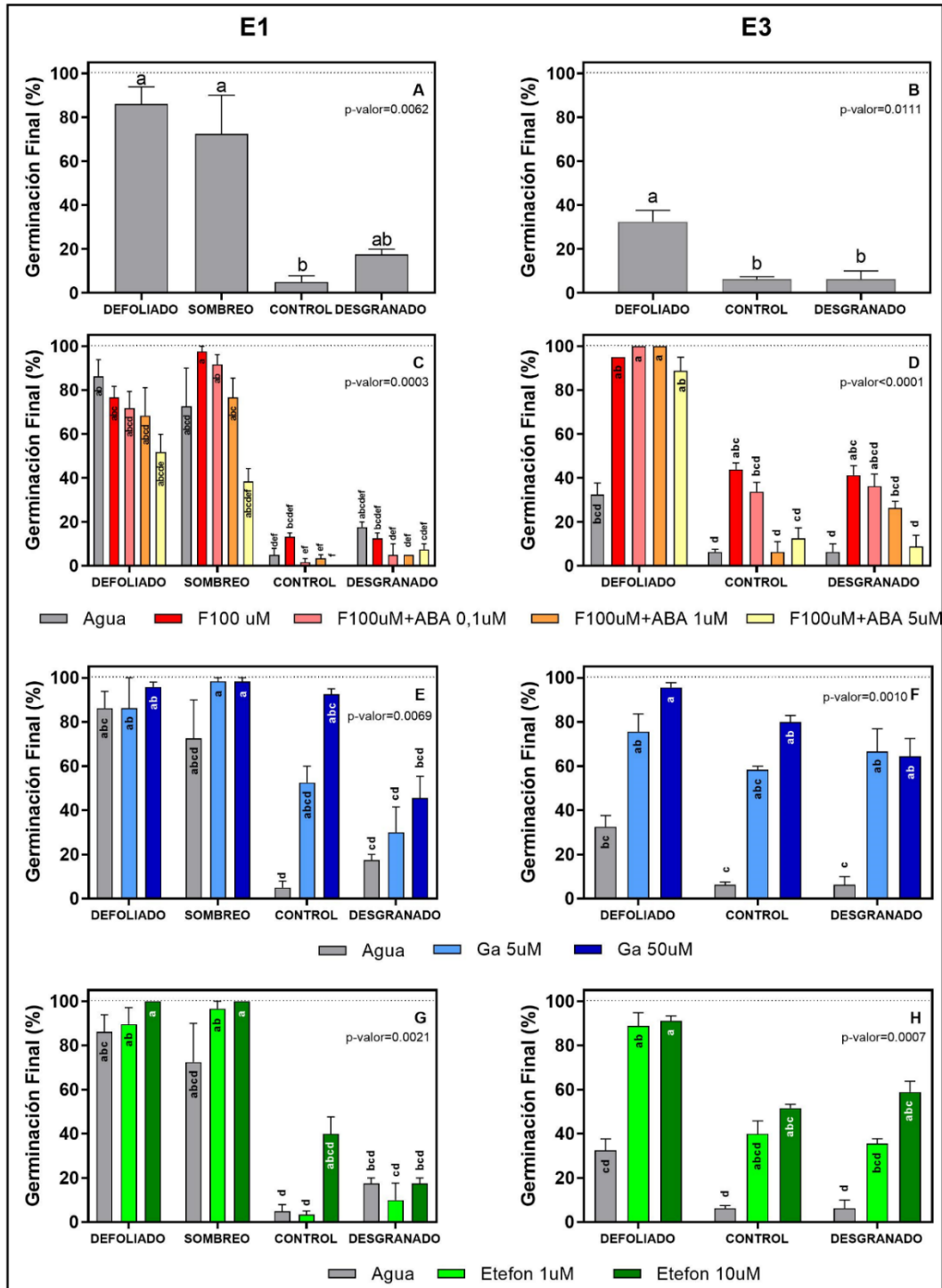
duración del llenado en este tratamiento sería mayor, tal como se reportó en la sección anterior. Por su parte, en el E4 (1579) no se registraron diferencias entre tratamientos en la dinámica de pérdida de humedad del fruto hasta cosecha (Fig. 5.3; Cuadro S5.3), aunque el porcentaje de humedad a MF fue diferente entre tratamientos (E4; Fig. 5.3).

La partición del peso seco del fruto en sus estructuras pepita y pericارpo difirió significativamente ( $p$ -valor $<0.05$ ) entre tratamientos de FD observándose mayor peso de ambos componentes del fruto a medida que se aumentó la relación FD (Cuadro S5.5). Con respecto a las dimensiones del fruto (largo, ancho y espesor), los tratamientos Desgranado y BD presentaron, en general, valores superiores que el Control, Raleo, Defoliado, Sombreo y AD. Sin embargo, parecería ser el espesor del fruto la variable más sensible a los cambios en la relación FD entre tratamientos (Cuadro S5.5).

En el E4, los tratamientos BD y Raleo presentaron un rendimiento por planta similar entre sí y mayor que el observado para el tratamiento AD. Sin, embargo, el aumento en la densidad de plantas (AD) determinó un mayor rendimiento por superficie (Cuadro S5.4).

### 5.3.2. Germinación de embriones en desarrollo.

La germinación de los embriones en desarrollo (40% de humedad del fruto) incubados en diferentes medios de incubación difirió entre tratamientos de FD para los dos genotipos ensayados (Fig. 5.4). En agua, en ambos experimentos (Fig. 5.4A, Fig. 5.4B), los embriones provenientes de los tratamientos Defoliado y Sombreo presentaron mayor germinación que los provenientes del Control y Desgranado, aunque estas diferencias fueron menores para el genotipo 1579 (E3), ya que sus embriones presentaron un mayor nivel de dormición que los del genotipo 1552.



**Fig. 5. 4.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 25°C provenientes de frutos en desarrollo con un 40% de humedad en E1 (1552) y E3 (1579). Los embriones fueron incubados en los siguientes medios: agua (gris), F100 combinado con soluciones de ABA con concentraciones crecientes (gama de colores rojo, naranja y amarillo), concentraciones crecientes de GAs (gama de colores azules) y etefón (gama de colores verdes). Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por genotipo) con letras diferentes, cuando la interacción entre los tratamientos de FD y concentración de hormonas fue significativa. El análisis se realizó según el test de Kruskal–Wallis (en cada panel se exhibe el p-valor de la interacción entre FD\*concentración de hormonas).

Cuando se agregó al medio de incubación F100 y concentraciones crecientes de

ABA, el tratamiento Defoliado del genotipo 1579 (E3; Fig. 5.4D) presentó una menor sensibilidad al ABA que el resto de los tratamientos. En el genotipo 1552 (E1; Fig. 5.4C) los tratamientos Control y Desgranado presentaron bajos porcentajes de germinación en F100, lo que impidió determinar su sensibilidad al ABA. Sin embargo, el tratamiento Defoliado presentó una menor sensibilidad al ABA que el Sombreo.

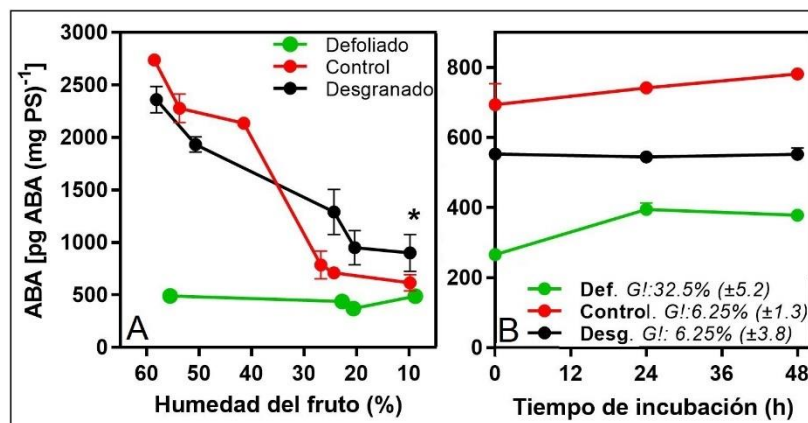
La incorporación de GAs y etefón también generó diferencias entre los tratamientos de FD y genotipos. En el genotipo 1552 (E1), los embriones del tratamiento Control presentaron una mayor respuesta a ambas hormonas que los del tratamiento Desgranado, mientras que los tratamientos Defoliado y Sombreo presentaron alta germinación en agua, lo que impidió evaluar su respuesta a ambas hormonas (Fig. 5.4E, Fig. 5.4G). En el genotipo 1579 (E3), no se observan diferencias claras entre tratamientos en relación a la sensibilidad a las GAs (Fig. 5.4F), mientras que el Defoliado parecería mostrar más respuesta al agregado de etefón que los otros tratamientos (Fig. 5.4H). Cuando en lugar de incubarse embriones se incubaron frutos, no se observó germinación en ninguno de los medios de incubación (resultados no presentados).

### 5.3.3. Contenido endógeno de ABA hacia el final del desarrollo del fruto en la planta madre y durante la incubación de frutos inmaduros.

El contenido endógeno de ABA de los ejes embrionarios durante la última etapa del llenado (MF-MC) difirió entre tratamientos de FD (Fig. 5.5A). Los embriones del tratamiento Defoliado mostraron un contenido de ABA significativamente menor que el Control y el Desgranado, incluso en el primer muestreo cuando los frutos tenían un 55% humedad. Por su parte el tratamiento Control presentó un mayor nivel endógeno de ABA que los ejes del Desgranado en los muestreos con alta humedad del fruto. Sin embargo, en frutos con menor porcentaje de humedad, el Desgranado presentó un contenido

endógeno de ABA superior al Control, aunque sin observarse diferencias significativas. Las diferentes dinámicas de contenido endógeno de ABA determinaron diferencias en el nivel endógeno de la hormona a MC, donde el tratamiento Defoliado presentó un menor nivel de ABA endógeno que el Control y el Desgranado, que no difirieron entre sí. En relación al contenido de ABA de los ejes embrionarios durante la incubación en agua de frutos con 40% de humedad, el tratamiento Defoliado mostró un menor contenido que el Desgranado y éste que el Control durante las primeras 48 horas de incubación (Fig. 5.5B). Por otro lado, no se observaron diferencias en el contenido de ABA en relación a la incubación en agua cuando la incubación se realizó en F100 (datos no presentados), sugiriendo ausencia de síntesis de ABA *de novo*, como fue observado en el capítulo 3 para este genotipo (Fig. 3.7). Más allá de que el Defoliado aumentara el nivel de ABA de los ejes a las 24 horas, éste se mantuvo muy por debajo de los niveles presentados por los otros dos tratamientos, que permanecieron constantes durante toda la duración de la incubación. En línea con el nivel de ABA, los embriones del tratamiento Defoliado presentaron un mayor porcentaje de germinación que los del Control y Desgranado (ver inset Fig. 5.5B), sugiriendo que la mayor germinación de los embriones del tratamiento de menor relación FD podría explicarse por un menor nivel de ABA endógeno durante la incubación. Cabe destacar que los valores absolutos de los niveles de ABA difirieron entre los tratamientos según se trate de un análisis (Fig. 5.5A) u otro (5.5B). Esto se debe a que las determinaciones se realizaron en corridas independientes, lo que inhabilita su comparación en valores absolutos. Luego del secado a 6%, los ejes embrionarios mantuvieron las diferencias en contenido de ABA observadas hacia la MC. Los provenientes del tratamiento Defoliado presentaron un menor contenido endógeno de ABA ( $451.24 \pm 18.0$  pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) que los tratamientos Control ( $823.07 \pm 149.7$  pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) y Desgranado ( $715.85 \pm 58.8$  pg ABA mg PS<sup>-1</sup>).

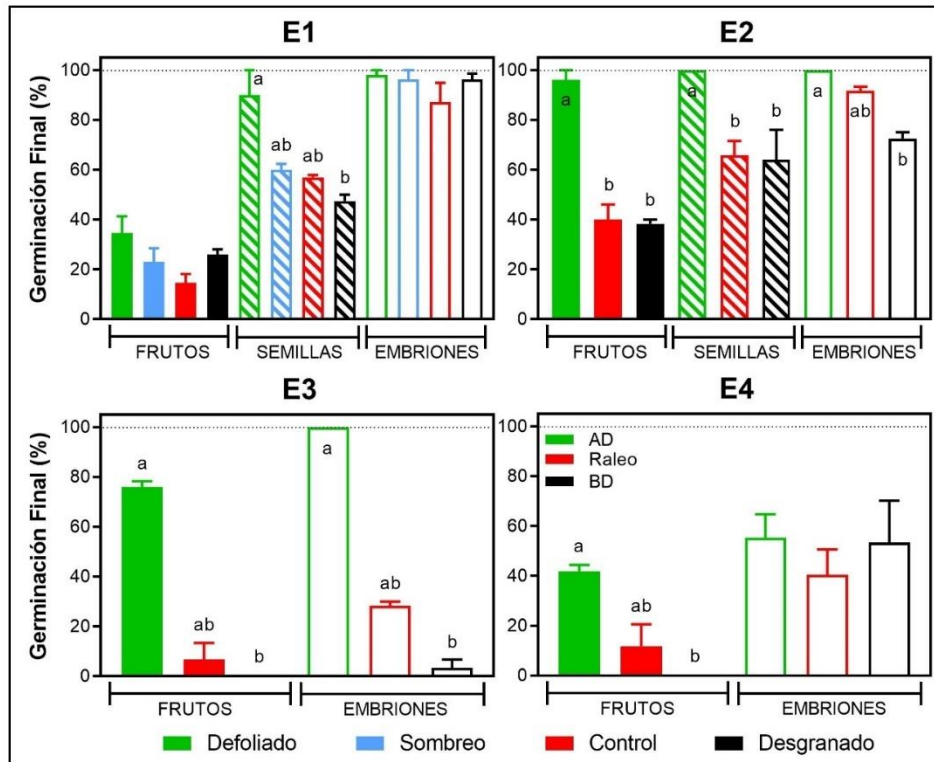




**Fig. 5. 5.** Contenido endógeno de ABA (pg ABA mg PS<sup>-1</sup>) en ejes embrionarios en función del porcentaje de humedad de los frutos (A) y en función del tiempo de incubación en frutos inmaduros con 40% de humedad (B) para los tres tratamientos de FD (Defoliado en verde, Control en rojo y Desgranado en negro) del E3 (1579). Los puntos indican la media del contenido endógeno de ABA ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. El asterisco en la figura A indica que las diferencias entre tratamientos de FD sobre el contenido de ABA a MC (11% de humedad del fruto) fue significativo ( $p$ -valor<0.001). En la figura B se indica el valor promedio de germinación (G!) de embriones ( $\pm$ EE, n=3) luego de 15 días de incubación.

#### 5.3.4. Germinación a cosecha.

La germinación de las distintas estructuras que componen el fruto a cosecha mostró diferencias entre tratamientos (Fig. 5.6). En todos los experimentos, los frutos y semillas (cuando se evaluó esta estructura) del tratamiento Defoliado presentaron un mayor porcentaje de germinación que el resto de los tratamientos. En relación a los embriones, en el genotipo 1552 (E1) no se observaron diferencias, ya que en todos los tratamientos se observaron altos porcentajes de germinación. En el genotipo 1579 (E2 y E3) el tratamiento Defoliado mostró mayor germinación que el Control y el Desgranado, indicando el alto grado de dormición embrionaria que presenta este genotipo cuando no se restringe la fuente fotosintética. Por último, en el E4 (1579), no se observaron diferencias entre tratamientos en la germinación de los embriones, aunque los frutos provenientes del tratamiento de AD mostraron mayor germinación que los provenientes del tratamiento de Raleo y BD.



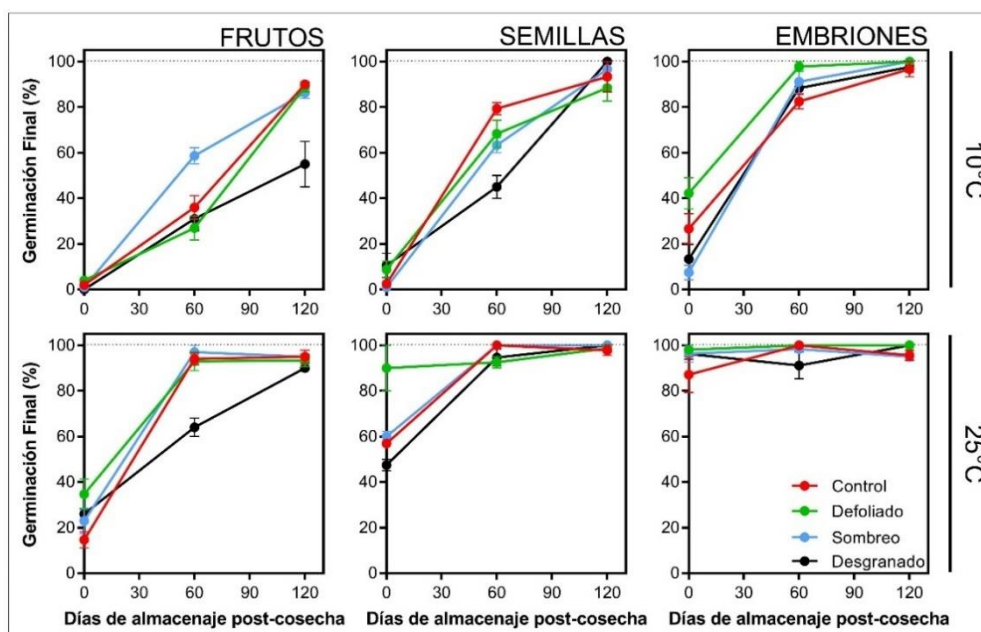
**Fig. 5. 6.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones a cosecha incubados a 25°C en agua destilada, provenientes de los diferentes experimentos de FD (E1 1552; E2, E3 y E4 1579). Las barras llenas indican la germinación de los frutos enteros, las barras con líneas diagonales blancas, las semillas y las barras vacías, los embriones. El color verde representa el tratamiento Defoliado o de AD; el color rojo, el tratamiento Control o Raleo; el color negro, el Desgranado o de BD y el color azul, el tratamiento Sombreo. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por experimento y estructura) entre tratamientos de FD con letras diferentes, según la significancia del test de Kruskal–Wallis (E1[1552] frutos: p-valor= 0.159; E1[1552] semillas: p-valor= 0.004; E1[1552] embriones: p-valor= 0.667; E2[1579] frutos: p-valor= 0.043; E2[1579] semillas: p-valor= 0.044; E2[1579] embriones: p-valor= 0.004; E3[1579] frutos: p-valor=0.036; E3[1579] embriones: p-valor=0.004; E4[1579] frutos: p-valor=0.014; E4[1579] embriones: p-valor=0.829).

### 5.3.5. Germinación durante el almacenaje post-cosecha.

#### 5.3.5.1. E1 (genotipo 1552).

Más allá de las diferencias observadas al momento de la cosecha (Fig. 5.6), la dinámica de salida de dormición de las distintas estructuras del fruto en el genotipo 1552 mostró pocas diferencias entre los tratamientos de FD debido a una salida de la dormición relativamente rápida en la mayoría de las condiciones de incubación (Fig. 5.7). Sin embargo, se observaron algunas diferencias que concuerdan con lo observado a cosecha, particularmente en frutos incubados a bajas temperaturas. Por ejemplo, a los 60 días de

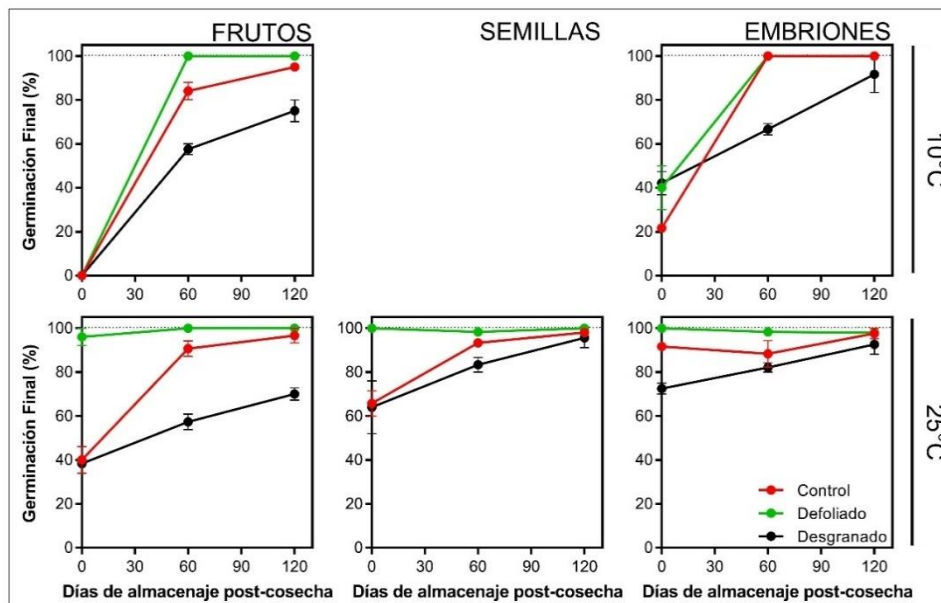
almacenaje post-cosecha se observó un porcentaje de germinación mayor en frutos del tratamiento Sombreo en relación al resto de los tratamientos. Por otro lado, a esta misma temperatura de incubación, los frutos del Desgranado apenas superaron el 50% de la germinación luego de 120 días de almacenaje, mientras que el resto de los tratamientos mostraron una germinación cercana a 90%. Las semillas incubadas a 10°C provenientes del tratamiento Desgranado también evidenciaron menor porcentaje de germinación que los demás tratamientos a los 60 días de almacenaje post-cosecha. Cuando la incubación se realizó a 25°C, se observó un menor porcentaje de germinación de frutos almacenados por 60 días en el tratamiento Desgranado en comparación al resto de los tratamientos. Los tratamientos de FD no ejercieron una diferencia apreciable en la germinación durante el almacenaje de semillas y embriones bajo ambas temperaturas de incubación.



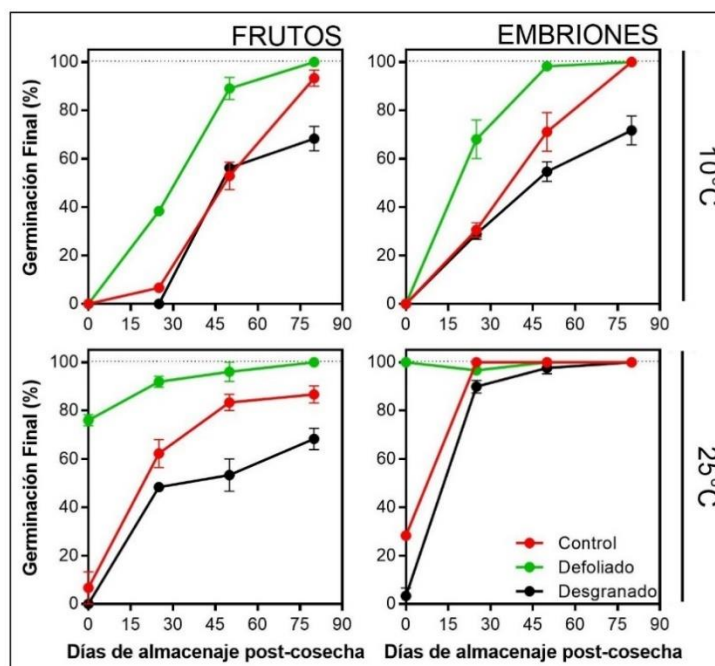
**Fig. 5. 7.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones del genotipo 1552 (E1) incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha provenientes de los tratamientos de FD. Las líneas rojas representan al tratamiento Control, las verdes, al tratamiento Defoliado, las azules, al Sombreo y las negras, al Desgranado. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### 5.3.5.2. E2 y E3 (genotipo 1579).

En los dos años experimentales, los frutos, semillas y embriones del genotipo 1579 expuestos al tratamiento Defoliado presentaron durante el almacenaje un mayor porcentaje de germinación a 10 y 25 °C que los tratamientos Control y Desgranado (Fig. 5.8, Fig. 5.9). A su vez, el tratamiento Desgranado presentó menores valores de germinación durante el almacenaje que el tratamiento Control. En los dos años se observa una estrecha relación entre la germinación de los frutos y los embriones a 10°C, sugiriendo que estos serían los responsables del nivel de dormición del fruto entero. Por el contrario, a 25°C, los embriones exhibieron un porcentaje de germinación superior al observado en los frutos, sugiriendo que a esta temperatura de incubación parte de la dormición del fruto entero sería atribuible al efecto del pericarpo.



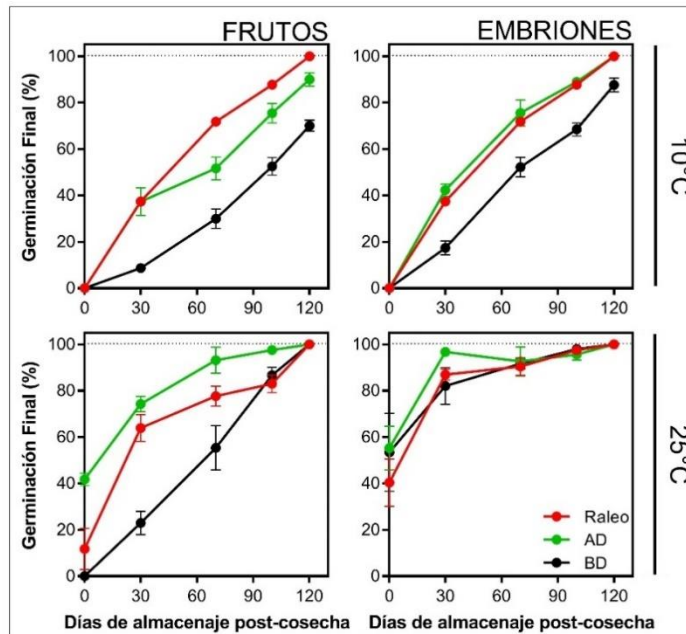
**Fig. 5. 8.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones del genotipo 1579 (E2) incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha provenientes de los tratamientos de FD. Las líneas rojas representan al tratamiento Control, las verdes, al tratamiento Defoliado y las negras, al Desgranado. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.



**Fig. 5. 9.** Porcentaje final de germinación de frutos y embriones del genotipo 1579 (E3) incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha provenientes de los tratamientos de FD. Las líneas rojas representan al tratamiento Control, las verdes, al tratamiento Defoliado y las negras, al Desgranado. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

#### 5.3.5.3. E4 (genotipo 1579).

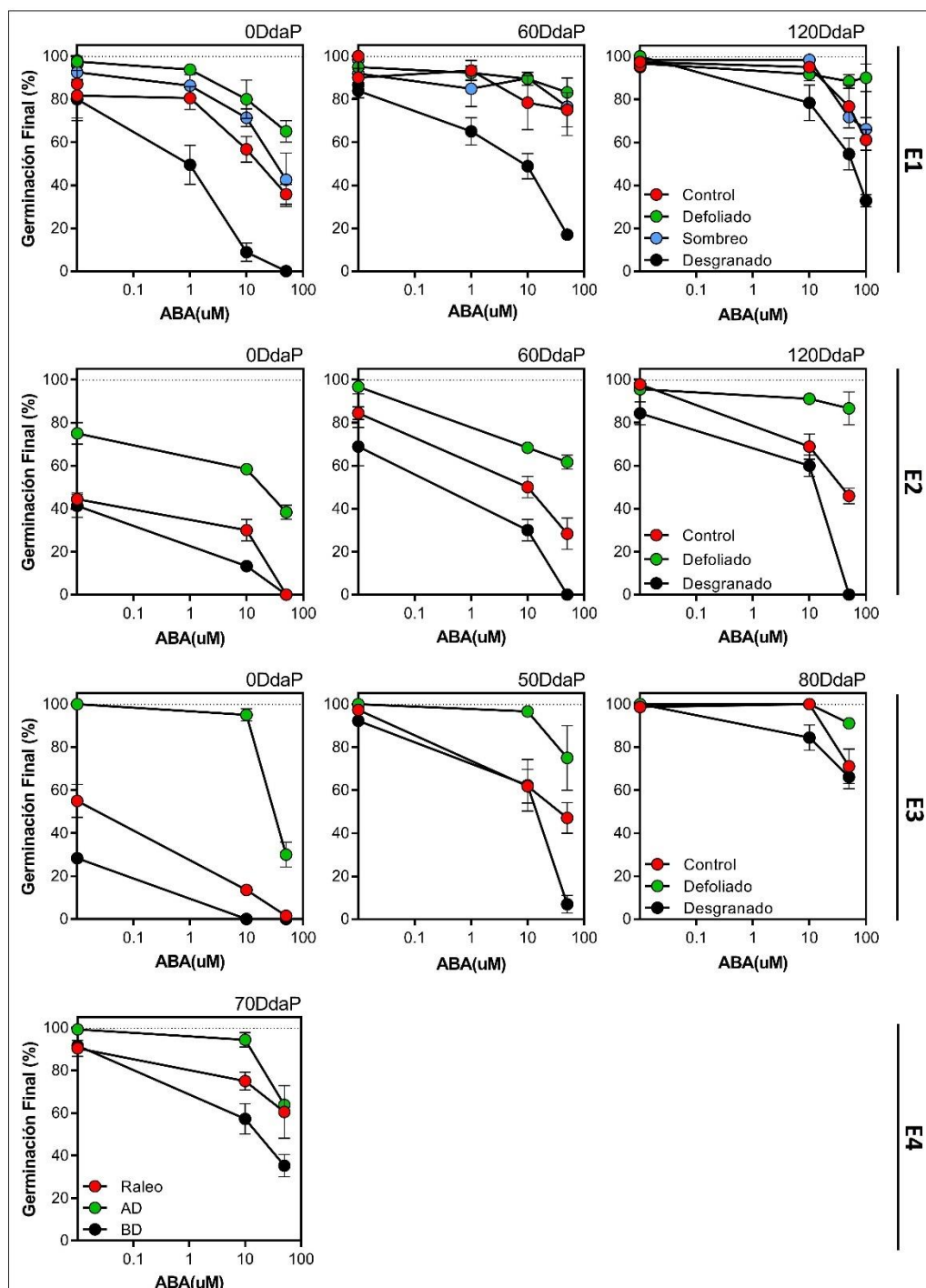
Los cambios en la densidad de siembra y el raleo de plantas en R6 provocaron diferencias en la dinámica de salida de la dormición de frutos y embriones en el genotipo 1579 (Fig. 5.10). Frutos incubados a ambas temperaturas provenientes del tratamiento de BD presentaron una salida de la dormición más lenta que los de los tratamientos de AD y Raleo. A 10°C, por ejemplo, los frutos y embriones del tratamiento de BD presentaron menores valores de germinación final que los otros tratamientos luego de los 3 meses de almacenaje. Los frutos del tratamiento donde se ralearon las plantas en R6 presentaron una menor germinación durante el almacenaje post-cosecha que los del tratamiento AD cuando fueron incubados a 25°C. Sin embargo, a 10°C, el tratamiento Raleo mostró una mayor germinación que el AD a partir de los 30 días de almacenaje. Los embriones pertenecientes al tratamiento BD presentaron valores de germinación inferiores a los otros dos tratamientos.



**Fig. 5. 10.** Porcentaje final de germinación de frutos y embriones del genotipo 1579 (E4) incubados a 10°C (panel superior) y 25°C (panel inferior) en función de los días desde el almacenaje post-cosecha. Las líneas rojas representan al tratamiento Raleo, las verdes, al tratamiento AD y las negras, al tratamiento BD. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### 5.3.6. Sensibilidad de embriones al ABA durante el almacenaje post-cosecha.

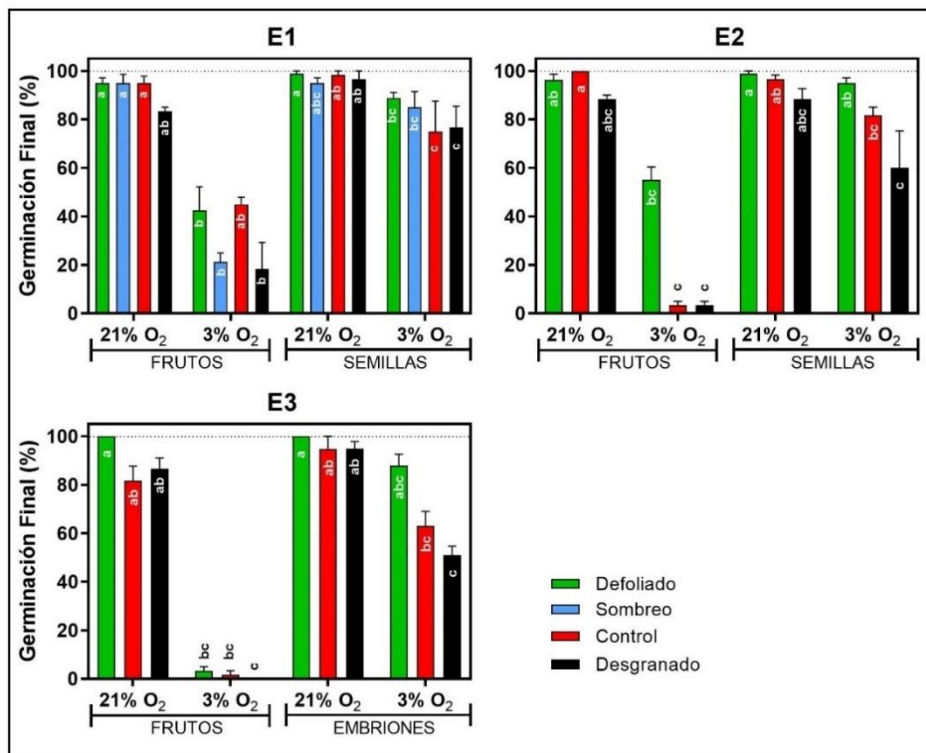
Conforme los frutos fueron disminuyendo su nivel de dormición durante el almacenaje, se observó una disminución de la sensibilidad de los embriones al efecto inhibitorio del ABA (Fig. 5.11). Sin embargo, en casi todos los experimentos y momentos de muestreo, los embriones de los tratamientos donde se restringió la fuente fotosintética (Defoliado y Sombreo) presentaron una menor sensibilidad al ABA que el tratamiento Control, mientras el tratamiento donde se aumentó la fuente (Desgranado) presentó una mayor sensibilidad que este último. En el experimento donde se varió la densidad a los 70 días de almacenaje post-cosecha, el tratamiento de AD mostró una menor sensibilidad al ABA que el Raleo, mientras que el tratamiento de BD fue el más sensible al agregado de ABA exógeno.



**Fig. 5. 11.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 25°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdAP), para los distintos experimentos de FD (E1 1552; E2, E3 y E4 1579). Los puntos rojos representan al tratamiento Control y Raleo, los verdes, al tratamiento Defoliado y AD, los azules, al Sombreo y los negros, al Desgranado y BD. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como  $x=0$  están graficados como  $x=0.01$ , y representan a embriones incubados en F100.

### 5.3.7. Sensibilidad a la hipoxia y efectos sobre la sensibilidad al ABA.

En todos los experimentos, la hipoxia disminuyó la germinación de frutos, semillas y embriones (Fig. 5.12). Sin embargo, se observó un mayor efecto inhibitorio en los frutos que en las semillas y embriones. En relación a los tratamientos de FD y la germinación de los frutos, sólo se observaron diferencias significativas en el E2, donde el tratamiento Defoliado presentó menor inhibición en la germinación frente a una incubación en condiciones limitantes de O<sub>2</sub> que los tratamientos Control y Desgranado. En el E1 (1552) y E3 (1579) no se observaron diferencias significativas en germinación de frutos entre tratamientos de FD en relación a la incubación en diferentes concentraciones de O<sub>2</sub>. Por su parte, las semillas del E1 (1552) y los embriones del E3

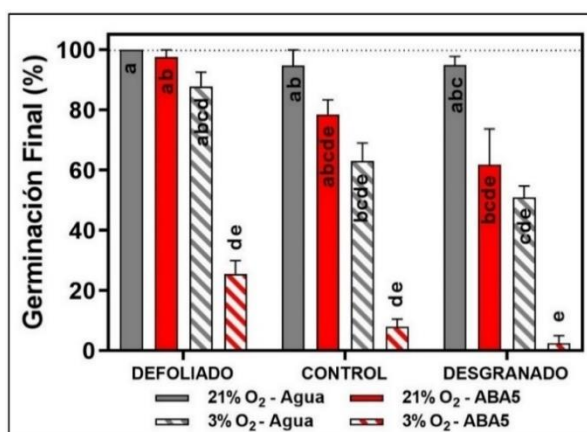


**Fig. 5. 12.** Porcentaje final de germinación de frutos, semillas y embriones, según corresponda, incubados a 25°C en agua destilada bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21% O<sub>2</sub> y 3% O<sub>2</sub>. Las barras verdes representan al tratamiento Defoliado, las rojas, al tratamiento Control, las negras, al Desgranado y las azules, al Sombreo. Para los E1(1552) y E2(1579), el ensayo se realizó a los 120 días de almacenaje post-cosecha, mientras que, para el E3(1579), a los 100 días. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación (por experimento y estructura) cuando la interacción entre los tratamientos FD y las concentraciones de O<sub>2</sub> fue significativa según la significancia del test de Kruskal–Wallis (E1[1552] frutos: p-valor<0.001; E1[1552] semillas: p-valor= 0.023; E2[1579] frutos: p-valor=0.003; E2[1579] semillas: p-valor=0.010; E3[1579] frutos: p-valor=0.008; E3[1579] embriones: p-valor=0.014).



(1579) pertenecientes al tratamiento Desgranado incubados en hipoxia, inhibieron significativamente su germinación en relación a los incubados en una atmósfera normal de O<sub>2</sub>, mientras que el resto de los tratamientos (Defoliado, Sombreo y Control) mantuvieron porcentajes de germinación similares bajo ambas atmósferas (Fig. 5.12).

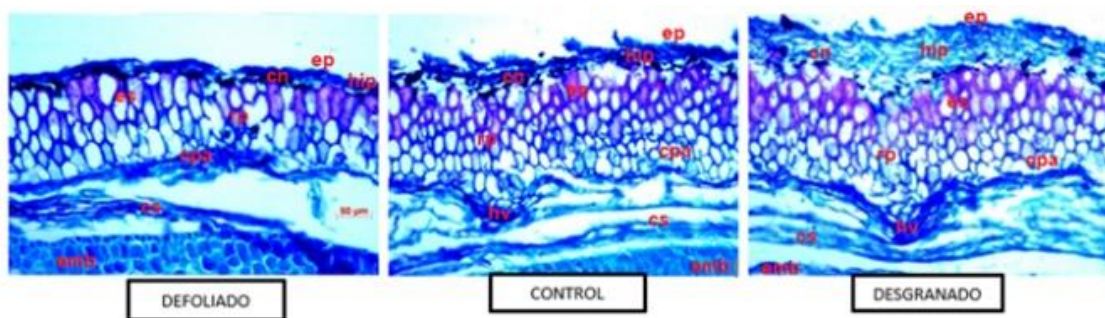
La hipoxia redujo la germinación de los embriones en agua, pero no se observaron efectos significativos sobre la sensibilidad de los mismos al ABA (Fig. 5.13). Sin embargo, en términos porcentuales los embriones del tratamiento Defoliado presentaron una menor inhibición al ABA en hipoxia que los embriones del tratamiento Control y Desgranado. Por ejemplo, en ABA 5µM, se registró una disminución en la germinación de embriones incubados a 3% O<sub>2</sub> relativo al máximo obtenido en una atmósfera normal de 70.9%, 87.2% y 95.1% para los tratamientos Defoliado, Control y Desgranado, respectivamente.



**Fig. 5. 13.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 25°C en agua destilada o en ABA 5µM, bajo concentraciones de O<sub>2</sub> contrastantes: 21% O<sub>2</sub> y 3% O<sub>2</sub>. Las barras grises representan a un medio de incubación con agua y a 21% O<sub>2</sub>; las barras rojas, a un medio con ABA 5µM en 21% O<sub>2</sub>; las barras con líneas diagonales grises, agua y 3% O<sub>2</sub>; y las barras con líneas rojas diagonales, ABA 5µM y 3% O<sub>2</sub>. Este ensayo se realizó en E3(1579), a los 100 días de almacenaje post-cosecha. Las barras indican el promedio de germinación (±EE, n=3). Se indica la diferencia significativa del porcentaje de germinación cuando la interacción entre los tratamientos FD, la concentración de O<sub>2</sub> y la concentración de ABA fue significativa según la significancia del test de Kruskal–Wallis (p-valor=0.004).

### 5.3.8. Características anatómicas del pericarpio y potencial de crecimiento del embrión.

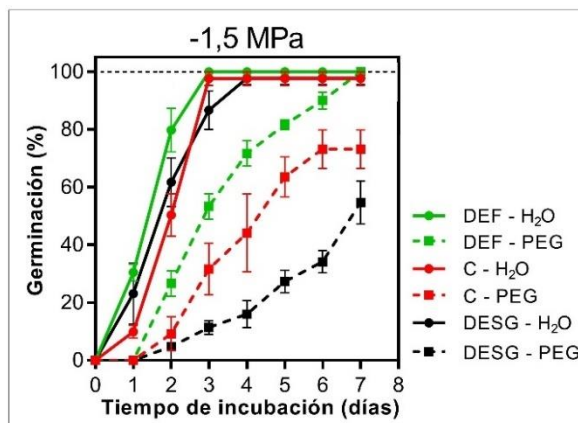
Los cortes histológicos del pericarpio en la zona central del fruto (Fig. 5.14) para los tres tratamientos evidenciaron cambios en el espesor del pericarpio ( $p$ -valor $<0.05$ ). El pericarpio del tratamiento Defoliado ( $106.5 \pm 14.0 \mu\text{m}$ ) presentó un menor espesor que el del Control ( $154.4 \pm 16.4 \mu\text{m}$ ), seguido por el Desgranado ( $213.6 \pm 10.1 \mu\text{m}$ ) que fue el tratamiento con el pericarpio de mayor peso seco (Cuadro S5.5). Estas diferencias en espesor se deben, en mayor parte, a que los tratamientos Desgranado y Control presentaron un mayor número de células en el sector del esclerénquima que el tratamiento Defoliado. Además, es evidente en el tratamiento Desgranado el mayor espesor de la hipodermis que el resto de los tratamientos. Adicionalmente, el tratamiento Defoliado determinó un aumento en la velocidad de imbibición de agua de frutos y semillas, expresado en porcentaje de peso inicial en comparación con lo observado en frutos provenientes de plantas Control y Desgranado (Fig. S5.2). Sin embargo, cuando se evaluó la cantidad absoluta de agua en función del tiempo de incubación, no se observaron diferencias entre tratamientos de FD.



**Fig. 5. 14.** Corte histológico del pericarpio del tercio medio del capítulo del genotipo 1579 (E3), para los tratamientos Defoliado, Control y Desgranado. Las referencias de las imágenes indican: ep: epidermis, hip: hipodermis, cn: capa negra, es: esclerénquima, rp: radio parenquimático, cpa: capa de parénquima aplastada, hv: haz vascular, cs: cubierta seminal (endosperma), emb: embrión. Escala =  $50 \mu\text{m}$ .

La disminución del potencial osmótico redujo de manera diferencial la germinación final de los embriones de los distintos tratamientos, donde los embriones provenientes del tratamiento Defoliado mostraron una menor reducción que los de

Control, y estos últimos una menor reducción que los embriones provenientes del tratamiento Desgranado (Fig. 5.15).



**Fig. 5. 15.** Porcentaje de germinación de embriones, provenientes de frutos a los 40 días de almacenaje post-cosecha, en función de los días de incubación según tratamiento de FD (Defoliado en verde, Control en rojo y Desgranado en negro) en el experimento 1579 (E3). Las líneas llenas y círculos indican que la incubación se llevó a cabo en agua destilada, mientras que las líneas punteadas y cuadrados, a una incubación en PEG6000 que genera un potencial osmótico de -1.5MPa. Los puntos (círculos y cuadrados) indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

#### 5.4. Discusión

La aplicación de tratamientos que determinaron una variación en la relación FD durante la etapa de desarrollo de los frutos produjo variaciones en el nivel de dormición de los embriones y frutos durante el desarrollo, la cosecha y la post-cosecha. Más allá de que las variaciones observadas fueron dependientes del genotipo (en concordancia con los resultados de los capítulos anteriores, se observó una mayor respuesta en el genotipo 1579 que en el 1552), restricciones en la fuente mediante defoliaciones, sombreos y AD determinaron frutos con un menor nivel de dormición, mientras que aumentos en la fuente mediante desgranados y BD determinaron un aumento del nivel de dormición en relación al tratamiento Control (Fig. 5.6, Fig. 5.7, Fig. 5.8, Fig. 5.9, Fig. 5.10). Por otro lado, la idea de que el nivel de dormición de los frutos estaría afectado por la fuente disponible por fruto durante el llenado es parcialmente sustentada por los resultados del tratamiento de Raleo de plantas en el planteo de alta densidad, donde aumentos en la fuente luego de

haberse determinado el número de frutos provocó un aumento del nivel de dormición de los frutos a 25°C de incubación en relación al tratamiento AD (Fig. 5.6, Fig. 5.10). Diversos trabajos en la bibliografía han reportado que disminuciones en la relación FD reducen el nivel de dormición de las semillas (defoliaciones en *Lolium multiflorum*, Deregibus et al., 1994; sombreos en *Datura ferox* y *Avena fatua*, Sánchez et al., 1981, Gallagher et al., 2013; plantas de soja sombreadas por maíces en sistemas de intercultivo, Chen et al., 2020). En relación al cultivo de girasol, Pizzorno (2021) observó que frutos de girasol creciendo en condiciones donde la radiación incidente fue disminuida artificialmente durante la primera parte del llenado del fruto presentaron un mayor porcentaje de germinación que los provenientes de plantas control (Pizzorno, 2021).

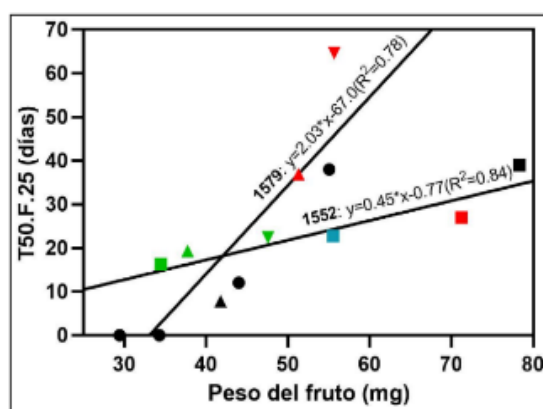
El efecto de las variaciones en FD determinó cambios en la dormición embrionaria y en la dormición impuesta por las cubiertas (Fig. 5.6). Como se observó en capítulos anteriores, los cambios en la dormición embrionaria se observaron a bajas temperaturas de incubación, mientras que los cambios en la dormición debida a la presencia de las cubiertas a 25°C (Fig. 5.7, Fig. 5.8, Fig. 5.9, Fig. 5.10) y fueron más evidentes en el tratamiento Desgranado. Estos cambios en el nivel de dormición estuvieron asociados a los mismos mecanismos estudiados en los capítulos anteriores. El menor nivel de dormición de los frutos determinado por una defoliación se asoció a un menor nivel de ABA endógeno de los ejes embrionarios durante las etapas finales del desarrollo de los frutos, tanto en seco (Fig. 5.5A) como durante la incubación (Fig. 5.5B). Trabajos en otras especies sugirieron que la disminución en la fuente fotosintética podría reducir el nivel de dormición a través de una disminución en el contenido de ABA de las semillas (Sánchez et al., 1981, Frascaroli et al., 2005, Chen et al., 2020). En girasol, Pizzorno (2021) demostró que frutos con un menor nivel de dormición provenientes de plantas que habían sido sometidas a sombreos durante el desarrollo de los frutos, presentaron un

menor nivel endógeno de ABA. Esta disminución en el contenido de ABA de los embriones durante el desarrollo podría deberse a una interrupción del ABA importado desde los tejidos maternos. La llegada de ABA materno al embrión es dependiente de la tasa de crecimiento de los tejidos (Benech-Arnold et al., 1991) y es importante en etapas iniciales del desarrollo de las semillas (Frey et al., 2004). Las hojas pueden ser una fuente de ABA durante las primeras etapas de desarrollo (Jones y Brenner, 1987), por lo que el Defoliado, a través del cese de acumulación de materia seca en los frutos (Fig. 5.2, Cuadro S5.2), posiblemente detuvo la importación del ABA desde estos tejidos. A su vez, el Defoliado puede afectar la condición hídrica de la planta, ya que tendrá un impacto en la tasa transpiratoria, lo que también podría provocar cambios en el ABA de origen materno. Aunque es conocido que el nivel de dormición se impone por el ABA producido por el propio embrión (Karszen et al., 1983; Le Page-Degivry y Garello, 1992; Frey et al., 2004), no se debería descartar el posible rol del ABA materno en dicha regulación. De hecho, Raz et al. (2001) demostraron que en *Arabidopsis* el ABA materno estaba implicado en la prevención de la viviparidad. En la misma especie, la aplicación de ABA exógenamente a plantas mutantes *aba* (deficiente en ABA) y *abi* (insensible al ABA) restauraron su capacidad de tolerar la desecación (Koornneef et al., 1989). Estas evidencias sugieren que el ABA materno podría ejercer un rol sobre la dormición de los frutos. En esta misma línea, en aquellos tratamientos con mayor fuente durante el llenado (Desgranado y Control), el mayor nivel de ABA endógeno podría estar asociado a una mayor duración del área foliar. Wang et al. (2018) mostraron que el mantenimiento del verdor en las cubiertas (que puede ser un indicador del carácter “stay green”, de retraso de la madurez del cultivo) de semillas de soja promueve la dormición aumentando el nivel de ABA endógeno.

Las variaciones en el nivel de dormición de los frutos como resultado de cambios en la relación FD guardó una asociación con la sensibilidad al ABA de los embriones durante el desarrollo y luego de la cosecha (Fig. 5.4, Fig. 5.11). Embriones de tratamientos de baja relación FD presentaron una menor sensibilidad al ABA (explicando el menor nivel de dormición del fruto entero) que los tratamientos que determinaron una alta relación FD. Una asociación similar fue observada en cariopses de sorgo, donde frutos más livianos, provenientes de tratamientos de estrés hídrico y nutricional durante el llenado, presentaron un menor nivel de dormición y embriones menos sensibles al ABA (Benech-Arnold et al., 1991, 1995). Estas referencias refuerzan las evidencias que se expusieron en los capítulos anteriores (3 y 4), mostrando que sería a través de la regulación de la sensibilidad de los embriones al ABA que el AM regula el nivel de dormición de los frutos a la cosecha y durante el almacenaje post-cosecha. A su vez, se observó que embriones de frutos con un menor nivel de dormición producto de defoliaciones presentaron una menor sensibilidad a la hipoxia y una menor sensibilidad al ABA en esta condición (Fig. 5.13). Estas evidencias ponen en relevancia el efecto de las variaciones en la relación FD sobre la fisiología del embrión que determinan su capacidad germinativa, como puede constatarse claramente en la diferente capacidad de germinación de los embriones cuando son incubados en una solución con un potencial osmótico de -1.5 MPa (Fig. 5.15).

Está ampliamente documentado que los cambios en la relación FD post-antesis modifican el peso final de los granos (López Pereira et al., 1999; Borrás et al., 2004; Ruiz y Maddonni, 2006). En el presente trabajo, una disminución en la fuente (Defoliado, Sombreo y AD) produjo frutos más livianos, mientras que un aumento (Desgranado y BD) produjo frutos más pesados y de mayor tamaño, en comparación con el tratamiento Control. Estas diferencias estuvieron explicadas por cambios en la duración y no en la

tasa de llenado (Fig. 5.2, Cuadro S5.2, Cuadro S5.5; Dosio et al., 2000; López Pereira et al., 2000; Aguirrezábal et al., 2003; Barros et al., 2004; Izquierdo et al., 2008). Este efecto sobre el peso de los frutos se relacionó en algunos trabajos con variaciones en el nivel de dormición, donde frutos más pesados se asociaron a un mayor nivel de dormición, y *viceversa* (Maun y Cavers, 1971; Mira et al., 2019). Por ejemplo, en girasol confitero, Saranga et al. (1998) observaron que el porcentaje de germinación a 15°C y de emergencia en arena de semillas de mayor tamaño (provenientes de tratamientos de remoción de frutos post-antesis y bajas densidades de siembra) fueron menores que los observados en semillas de menor tamaño (generadas de defoliaciones post-antesis y altas densidades de siembra). En el presente capítulo, se obtuvo una relación similar a la reportada por Saranga et al. (1998), donde el peso de los frutos se asoció positivamente con el nivel de dormición de los mismos. (Fig. 5.16).



**Fig. 5. 16.** Relación entre el nivel de dormición de frutos incubados a 25°C (T50.F.25) y el peso de los frutos. Los cuadrados, triángulos, triángulos invertidos y círculos indican al E1(1552), E2(1579), E3(1579), y E4(1579), respectivamente. El color verde representa al tratamiento Defoliado y AD, el celeste al Sombreo, el rojo al Control y Raleo y el negro al Desgranado y BD. Se presentan las ecuaciones lineales significativas (correlaciones lineales con  $p$ -valor $<0.05$ ), separadas por genotipo.

Los componentes del fruto, pepita y pericarpio, así como el espesor del pericarpio, sufrieron modificaciones por efecto de las manipulaciones en la relación FD (Fig. 5.14, Cuadro S5.5). El tratamiento Defoliado determinó un menor peso seco y espesor de pericarpio (Fig. 5.14, Cuadro S5.5), en concordancia con lo reportado por Lindström et al.

(2007) y Pizzorno (2021) con sombreos artificiales aplicados luego de la floración. Estas variaciones en el espesor del pericarpio podrían estar relacionadas a las diferencias en el nivel de dormición observadas como resultado de los tratamientos de FD. Por ejemplo, Pizzorno (2021) encontró una asociación positiva entre el nivel de dormición de frutos y el espesor del pericarpio, mientras que Andrade et al. (2015) observaron que genotipos de girasol con un mayor nivel de dormición presentaron un mayor espesor de la pared celular y una mayor esclerificación del pericarpio. Nuestros resultados muestran una relación significativa entre ambas variables ( $r$  Pearson = 0.99,  $p$ -valor < 0.05), lo que sugiere que estas variaciones en las características estructurales de las cubiertas podrían contribuir a explicar, en cierta medida, los efectos sobre la dormición observados en este capítulo. Maun y Cavers (1971) en *Rumex crispus* y Sultan (1996) en *Polygonum persicaria*, mostraron que la mayor capacidad de germinar en semillas que sufrieron alguna reducción en su fuente fotosintética (defoliación y limitación severa de radiación, respectivamente) se asoció con una reducción en el espesor de las cubiertas de las semillas, que favorecería la permeabilidad de las mismas al agua. En el presente trabajo, los cambios en la relación FD no estarían provocando variaciones en la permeabilidad de las cubiertas del fruto al agua, ya que la cantidad de agua que entra a la semilla es similar en los tres tratamientos (Fig. S5.2). Sin embargo, las diferencias estructurales en el pericarpio podrían determinar una diferente permeabilidad al O<sub>2</sub> que explique parte de los cambios observados en el nivel de dormición. Los frutos del Defoliado que presentaron un menor nivel de dormición mostraron un pericarpio más fino y de menor peso, que podría estar determinando una mayor difusión de O<sub>2</sub> al embrión (Fig. 5.12). Esto podría explicar, en parte, la menor sensibilidad a la hipoxia que presento este tratamiento en el E2, donde los frutos presentaron una germinación del 50% en 3% O<sub>2</sub>, mientras que en los otros tratamientos la germinación en esta condición fue nula (Fig. 5.12). Como fue



comentado en capítulos anteriores, los resultados obtenidos sugieren que los efectos de cambios en las relaciones FD afectarían la dormición del fruto de girasol a través de cambios en la sensibilidad al ABA de los embriones y, probablemente también, mediante cambios en las características estructurales del pericarpo que podrían estar modulando la difusión de O<sub>2</sub> al embrión. Sin embargo, se requieren estudios específicos que permitan establecer si existe una relación funcional entre los cambios observados en las características anatómicas de las cubiertas y la dormición de los frutos.

En los casos de las plantas defoliadas, la finalización anticipada del llenado del fruto (Fig. 5.2) determinó que la tasa de secado de los mismos fuera mayor que la del resto de los tratamientos (Fig. 5.3, Cuadro S5.3). Se ha observado en varias especies que la desecación prematura impuesta durante el desarrollo de la semilla da lugar al inicio de la germinación tras la imbibición posterior (Walker-Simmons y Sessing, 1990; Bewley et al., 2013; Lachabrouli et al., 2021). La síntesis de proteínas de desarrollo tardío que han demostrado jugar un papel en la expresión de la dormición (ABI3, ABI4 y ABI5; Kermode, 2005) podría suprimirse de forma permanente como consecuencia de la desecación. De esta manera, el secado prematuro del fruto, tanto en planta como aislado de la misma, podría disminuir la señalización del ABA y/o aumentar la sensibilidad a las GAs o el etileno (Corbineau et al., 1988; Bianco et al., 1994) tal como se demostró en algunos casos de embriones en desarrollo provenientes de tratamientos que exhibieron una mayor tasa de secado (Fig. 5.4). Estos resultados sugieren que la mayor tasa de desecación en planta observada en el tratamiento Defoliado también podría explicar, en parte, la mayor germinación observada en este tratamiento.

El atraso en la FS expone al cultivo a temperaturas y niveles de radiación incidente cada vez más restrictivos para su crecimiento durante la etapa post-antesis. Estas condiciones ambientales pueden afectar la relación FD durante el desarrollo de los frutos

en la planta madre. El presente capítulo investigó el efecto de variaciones en la relación FD post-antesis sobre el nivel de dormición de los frutos mediante diferentes tratamientos. A medida que se redujo la relación FD disminuyó el nivel de dormición y *viceversa*. Estas diferencias estuvieron explicadas por cambios en el contenido de ABA de los embriones durante el desarrollo y en la sensibilidad al ABA de los embriones. A su vez, los cambios estructurales observados en el pericarpo sugieren que cambios en la relación FD podrían estar regulando la dormición del fruto a través de variaciones en la tasa de difusión del O<sub>2</sub> al embrión. Esto podría interactuar en la sensibilidad a la hipoxia de los embriones como resultado de las variaciones en la relación FD. Más allá de la relevancia de los mecanismos fisiológicos develados, los resultados presentados también son útiles a la hora de tomar decisiones que afectan la estructura del cultivo (como fecha y densidad de siembra), ya que las condiciones restrictivas de radiación incidente (en FS tardías) o como resultado de sombreo de plantas vecinas (densidades de siembra altas) podrían causar una disminución en el nivel de dormición de las semillas o acelerar la salida de dormición de las mismas luego de la cosecha. Por lo tanto, el manejo de estas herramientas agronómicas puede ser considerado a la hora de producir semilla comercial con un menor nivel de dormición, dentro de rangos que no afecten significativamente el rendimiento del cultivo.

## **CAPÍTULO 6. Discusión General**

En este capítulo (i) se contrastan las hipótesis planteadas en el capítulo 1, (ii) se destaca el aporte de los resultados al avance del conocimiento y sus posibles aplicaciones agronómicas y (iii) se detallan las futuras líneas de investigación derivadas de los resultados obtenidos en esta tesis.

### **6.1. Contraste de hipótesis y desarrollo de un esquema conceptual**

#### **6.1.1. Efectos del Ambiente Materno explorado durante la etapa de desarrollo del fruto sobre el nivel de dormición.**

La presencia de dormición representa un problema para la industria productora de semillas ya que implica un retraso sustancial para la siembra inmediata de un próximo cultivo y/o dificulta, o directamente impide, la comercialización de las semillas (Maiti et al., 2006; Bodrone, 2014). Comprender cómo este carácter es modulado por el AM que exploran las semillas durante su desarrollo resulta esencial para tomar medidas que permitan mitigar esta problemática en los sistemas de producción de semilla comercial. En la presente tesis se aportan elementos fundamentales para comprender cómo el AM regula la dormición de los frutos en el cultivo de girasol. La aproximación metodológica utilizada, combinando distintos genotipos, AM y años experimentales, permitió generar un marco conceptual robusto en relación a los mecanismos fisiológicos implicados en esta regulación.

El nivel de dormición de un lote de semillas a cosecha está determinado en principio por el genotipo y es heredable (Arata et al., 2021). Sin embargo, es extremadamente plástico y está influenciado por una amplia gama de señales ambientales que tienen lugar durante la etapa de desarrollo de la semilla en la planta madre (Fenner, 1991). Por ejemplo, en girasol, Bodrone et al. (2017) y Pizzorno et al. (2014) observaron

que atrasos en la FS provocaron una disminución en el nivel de dormición de los frutos a cosecha y aumentaron la velocidad de salida de la dormición durante la post-cosecha en dos genotipos, un material híbrido y una línea endocriada, respectivamente. En la presente tesis, demostramos que esta respuesta a la FS es común para una amplia gama de genotipos de girasol, tanto silvestres como cultivados. Estos resultados nos permiten aceptar la hipótesis 1: “*Atrasos en la FS determinan un menor nivel de dormición de los frutos a cosecha y una mayor velocidad de salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha en una amplia gama de genotipos de girasol*”. Sin embargo, la magnitud y el tipo de respuesta (la temperatura en la que se expresa la dormición y los tejidos del fruto involucrados) difirieron entre genotipos (Fig. 2.1, Fig. 2.2, Fig. 2.3, Fig. 3.8, Fig. 3.9, Fig. 3.10, Fig. S2.1, Fig. 6.4). Por otro lado, aunque en todos los materiales estudiados las FS tardías determinaron un menor nivel de dormición de los frutos, en el ensayo de FS escalonadas (Fig. 2.4) se observó que el nivel de dormición disminuyó más marcadamente en FS a partir de diciembre, donde los cambios en las variables ambientales durante el desarrollo del fruto (temperatura, radiación) resultaron más contrastantes (Cuadro 2.4, Cuadro S2.2).

Además de los efectos de cambios en la FS, el nivel de dormición de los frutos también fue afectado por variaciones en la temperatura a las que se expusieron las plantas durante el desarrollo de los frutos (Fig. 4.10, Fig. 4.11, Fig. 6.4), lo que nos lleva a aceptar la hipótesis 2 “*La temperatura explorada por las plantas durante el desarrollo de los frutos afecta el nivel de dormición de los mismos a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha*”. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran, en concordancia con los previamente reportados por Bodrone et al. (2017), que menores temperaturas durante la etapa de desarrollo de los frutos determinan un menor nivel de dormición de los mismos. Asimismo, los resultados obtenidos confirman que la regulación de la dormición de los

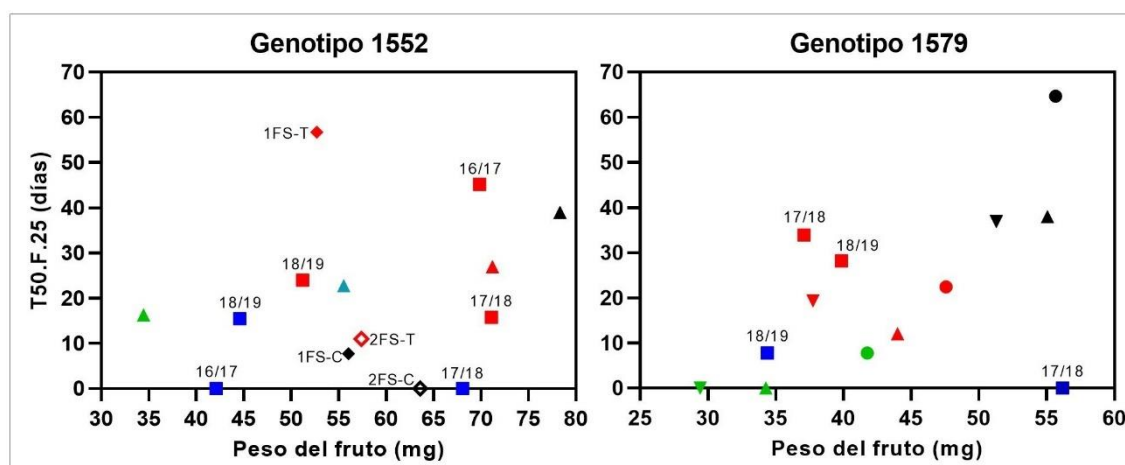
frutos por efecto del ambiente térmico tiene lugar hacia el final de la etapa de desarrollo y maduración de la semilla en la planta madre (luego de la MF; Cuadro S2.6, Fig. 4.14), tal como sugirieron Bodrone et al. (2017) en girasol y Rodríguez et al. (2001) en cebada. Esta información resulta útil a la hora de definir planteos de producción de semilla híbrida de girasol. En función de estos resultados podemos concluir que para obtener semillas con un menor nivel de dormición se debería intentar evitar, mediante variaciones en la fecha de siembra y/o zonas de producción, que el cultivo esté expuesto a altas temperaturas hacia el final del desarrollo del fruto en la planta madre, más particularmente luego de la MF. Esto toma aún más relevancia en el contexto actual de cambio climático (IPCC, 2018), donde la probabilidad de que ocurran eventos de alta temperatura será mayor. En la presente tesis también se exploró el efecto de altas temperaturas en FS contrastantes (Fig. 4.10, Fig. 4.11). El incremento en la temperatura aumentó el nivel de dormición a cosecha en ambas FS. Sin embargo, se observó una menor respuesta al aumento de la temperatura en la FS tardía, posiblemente por el menor nivel de radiación incidente que exploran los frutos durante su desarrollo bajo estas condiciones (Cuadro 2.2, Cuadro 2.4, Cuadro S2.2, Cuadro 3.1, Cuadro S3.1) y/o por un menor rango de temperaturas explorado en estas FS (Cuadro 4.1) que determina un menor nivel de dormición de los frutos. Fernández Farnocchia (2020) observó que el efecto de un menor nivel de radiación fue más relevante que el de la temperatura para definir el nivel de dormición en frutos de *Polygonum aviculare*.

Junto con las FS y la temperatura, una menor relación FD durante la etapa de desarrollo de los frutos (que incluyó un menor nivel de radiación incidente, tratamientos de defoliación y variaciones en la densidad de siembra) determinó un menor nivel de dormición de los mismos (Fig. 5.6, Fig. 5.7, Fig. 5.8, Fig. 5.9, Fig. 5.10, Fig. 6.4), en coincidencia con lo reportado por Pizzorno (2021) en experimentos de sombreo. Estos

resultados nos permiten aceptar la hipótesis 4 “*Los cambios en la relación FD que experimentan los frutos de girasol durante su etapa de desarrollo afectan el nivel de dormición de los mismos*”. Estos experimentos demostraron que la tasa de crecimiento post-floración afecta el nivel de dormición de los frutos en el cultivo de girasol (Fig. 5.2, Cuadro S5.2), aportando evidencias claras en relación a un factor que ha sido poco estudiado y que generalmente no se tiene en cuenta a la hora de evaluar aquellos factores que pueden modular el nivel de dormición. Disminuciones en la relación FD mediante defoliaciones, sombreado artificial y AD provocaron un menor nivel de dormición de los frutos, mientras que aumentos en la relación FD (mediante desgranado y BD) promovieron un aumento del nivel de dormición (Fig. 5.6, Fig. 5.7, Fig. 5.8, Fig. 5.9, Fig. 5.10, Fig. 6.4), corroborando los resultados previamente reportados en girasol por Saranga et al. (1998). De hecho, el aumento en la dormición de los frutos como resultado del raleo de plantas en siembras a alta densidad aportan evidencias claras de que cambios en la relación FD durante el desarrollo del fruto afectan el nivel de dormición de los mismos (Fig. 5.6, Fig. 5.10). Asimismo, se verificó la relación positiva que existe entre el nivel de dormición y el peso de los frutos, este último como una medida de la variación en la relación FD (Fig. 5.2, Fig. 5.6, Fig. 5.7, Fig. 5.8, Fig. 5.9, Fig. 5.10, Fig. 5.16, Cuadro S5.2).

Los efectos de una menor relación FD sobre el nivel de dormición podrían explicar, al menos en parte, el menor nivel de dormición de los frutos observado en FS tardías, ya que el atraso en la FS reduce la radiación interceptada acumulada durante el desarrollo del fruto en comparación con las FS tempranas debido a una caída en la radiación incidente (Cuadro 2.2, Cuadro 2.4, Cuadro 3.1, Cuadro S2.2, Cuadro S3.1) y a una menor duración del área foliar en post-antesis (de la Vega y Hall, 2002b). Estas condiciones promoverían una reducción en la fuente y, en consecuencia, en la relación

FD. Sin embargo, en FS tardías también se afecta negativamente el número de frutos (mayores temperaturas pre-floración disminuyen el número potencial de granos, Chimenti et al., 2001; y el menor nivel de radiación durante el cuaje del fruto disminuye el número final de granos, Cantagallo y Hall, 2002; Cantagallo et al., 2004), lo que puede provocar una compensación que no determine una variación significativa en la relación FD ni en el peso de los frutos en comparación a una FS temprana (de la Vega y Hall 2002b). Sin embargo, más allá de las variaciones en la FS, las variaciones del ambiente entre años para una misma FS podrían determinar cambios en la relación FD durante el período de desarrollo de los frutos que afecten el peso del fruto. En los ensayos realizados en esta tesis se observaron ambas situaciones (Fig. 6.1). En los años 16/17 y 18/19, el atraso en la FS determinó en ambos genotipos una disminución en el peso del fruto asociado a menores niveles de dormición (Fig. 6.1, comparar cuadrados rojos de FS tempranas vs cuadrados azules de FS tardías con el rótulo 16/17 y 18/19). Sin embargo, en el año 17/18, los frutos de la FS tardía presentaron un mayor peso (1579) o un peso similar (1552) que los de la FS temprana, pero igualmente los provenientes de FS tardías presentaron un menor nivel de dormición (Fig. 6.1, comparar cuadrados rojos de FS



**Fig. 6. 1.** Relación entre el nivel de dormición de frutos incubados a 25°C medido a través del tiempo en alcanzar el 50% de germinación durante el almacenaje a 25°C en seco (T50.F.25) y el peso de los frutos para ambos genotipos. Los cuadrados indican las FS (rojo para las tempranas y azul para las tardías), los rombos los ensayos de FS\*Tratamiento térmico (FS tempranas símbolos llenos, FS tardías símbolos vacíos; rojo tratamiento de alta temperatura y negro tratamiento control), los triángulos los tratamientos FD (verde defoliado, rojo control y negro desgranado) y los círculos los tratamientos de densidad (verde AD, rojo raleo y negro BD).

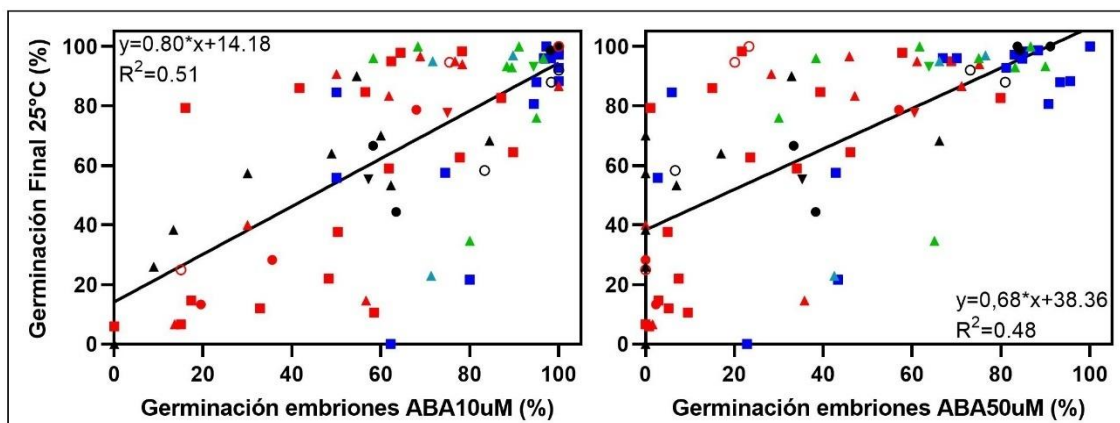
tempranas vs cuadrados azules de FS tardías con el rótulo 17/18). Estos resultados sugieren que más allá de que los cambios en la relación FD estén implicados en las variaciones en el nivel de dormición observadas como resultado de cambios en la FS, otros factores, probablemente de mayor relevancia, estarían involucrados en esta regulación.

Más allá de los diversos experimentos realizados para determinar el efecto de las diferentes variables ambientales sobre el nivel de dormición, el sistema experimental utilizado (FS) no nos permitió identificar la importancia relativa que cada factor podría tener sobre el nivel de dormición de los frutos ante variaciones en la FS. Esto se debe a la covarianza de los factores ambientales a medida que se atrasa la FS (Ceccato et al., 2015). Futuras investigaciones deberían tener por objetivo determinar el efecto relativo de los factores involucrados.

#### 6.1.2. Ambiente materno, regulación hormonal y su relación con el nivel de dormición.

Los resultados obtenidos a lo largo de la tesis muestran que los efectos del AM se explican en mayor medida por cambios fisiológicos que tendrían lugar en el metabolismo y la señalización de ABA del embrión (ver los esquemas conceptuales presentados en las Fig. 6.3 y Fig. 6.4). Particularmente, la sensibilidad al ABA de los embriones es el mecanismo que explicaría la dormición del fruto entero durante el almacenaje post-cosecha, tal como muestra la Fig. 6.2 y otras de la tesis (Fig. 3.11, Fig. 3.12, Fig. 4.12, Fig. 4.15, Fig. 5.11, Fig. S3.7). Los resultados obtenidos sugieren que esta sensibilidad de los embriones al ABA estaría determinada por una variación en el metabolismo del ABA observada durante el desarrollo del fruto en la planta madre (Cuadro 3.2, Fig. 3.6, Fig. 3.7, Cuadro 4.2, Fig. 4.9, Fig. 5.5, Fig. 6.4). En esta tesis, FS tardías (capítulo 3),





**Fig. 6. 2.** Relación entre la germinación de frutos y la germinación de embriones incubados en dos concentraciones de ABA (10 y 50 $\mu$ M) a 25°C. Se presentan todos los datos de la tesis, desde la cosecha hasta el último momento del almacenaje post-cosecha evaluado en cada caso. Los cuadrados indican los experimentos del capítulo 3 (FS), los círculos los del capítulo 4 y los triángulos los del capítulo 5. Los diferentes colores representan los tratamientos: rojo para FS tempranas, tratamiento de alta temperatura (capítulo 4) y controles y raleo (capítulo 5); azul para FS tardías y sombreo; verde para Defoliado y AD; negro para controles de capítulo 4 y tratamientos de Desgranada y BD. La relación entre las dos variables fue significativa ( $p$ -valor<0.05) en ambos casos.

reducciones en la temperatura tanto en FS contrastantes como hacia el final del desarrollo del fruto (capítulo 4) y disminuciones en la relación FD (capítulo 5) generaron un menor contenido endógeno de ABA (tanto en seco como en incubación) y una menor capacidad de síntesis de ABA durante la incubación. Esta disminución en el contenido endógeno de ABA y síntesis de ABA se asoció a embriones con una menor sensibilidad al ABA y frutos con un menor nivel de dormición a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha (Fig. 3.11, Fig. 3.12, Fig. 4.12, Fig. 4.15, Fig. 5.11, Fig. S3.7, Fig. 3.8, Fig. 3.9, Fig. 3.10, Fig. 3.8, Fig. 4.10, Fig. 4.11, Fig. 5.6, Fig. 5.7, Fig. 5.8, Fig. 5.9, Fig. 5.10, Fig. 6.2, Fig. 6.4). Esta hipótesis guarda concordancia con reportes en la literatura donde alternaciones en el metabolismo del ABA durante el desarrollo de los frutos afectaron la sensibilidad al ABA de los embriones (Le Page-Degivry y Garello, 1992; Ni y Bradford, 1993; Kawakami et al., 1997; Steinbach et al., 1997; Huo y Bradford, 2015). Además, los resultados confirman las evidencias preliminares reportadas por Bodrone et al. (2017) y Pizzorno (2021) en relación a la sensibilidad al ABA y al nivel endógeno de ABA, respectivamente, como dos posibles mecanismos que estarían regulando la dormición en

frutos de girasol como consecuencia de variaciones en el AM. Este efecto sobre el metabolismo y señalización del ABA de los embriones y el nivel de dormición de los frutos se observó en todos los experimentos realizados, donde se varió la FS, la temperatura y la relación FD (Fig. 6.4). Esto muestra que en el girasol la regulación ejercida por distintos factores del ambiente sobre el nivel de dormición de los frutos parecería converger en los mismos mecanismos. En otras palabras, el AM regula la dormición del fruto a través del mismo nodo de comunicación que converge en un cambio en la fisiología del embrión que determina su capacidad germinativa. En función de lo comentado, los resultados nos llevan a aceptar parcialmente la hipótesis 5: “*Los efectos del AM sobre la dormición del fruto están asociados a cambios en la sensibilidad al ABA y GAs y/o en el metabolismo de ABA de los embriones durante la etapa de desarrollo de los frutos*”, ya que, si bien los efectos del AM estuvieron asociados a cambios en la sensibilidad y el metabolismo de ABA, no se observó un efecto significativo del AM sobre la sensibilidad a las GAs y al etileno (Fig. 3.3, Fig. 3.4, Fig. 4.7, Fig. 5.4, Fig. S3.2, Fig. S3.3, Fig. S3.5, Fig. S4.1).

Las variaciones en el ambiente también determinaron modificaciones en el grosor del pericarpio. Los tratamientos de AM que aumentaron el nivel de dormición de los frutos presentaron pericarpos más gruesos (Fig. 3.15, Fig. 5.14, Fig. 6.4), en concordancia con resultados previamente reportados por Pizzorno (2021). Estos resultados permiten aceptar la hipótesis 6: “*Los efectos del AM sobre la dormición impuesta por cubiertas están asociados a cambios en las características anatómicas de las mismas*”. Las cubiertas del fruto de girasol interfieren con el intercambio gaseoso exponiendo al embrión a una condición de hipoxia que podría estar involucrada en la regulación de la dormición del fruto (Corbineau y Côme, 1995; Rolletschek et al., 2007; Borisjuk y Rolletschek, 2009) a través de la modulación de la sensibilidad al ABA de los embriones

(Domínguez et al., 2019). A lo largo de esta tesis se observó que el AM alteró la sensibilidad de los embriones a la hipoxia. FS tempranas, altas temperaturas y alta relación FD durante el desarrollo presentaron embriones más sensibles a ser inhibidos por condiciones de hipoxia (Fig. 3.13, Fig. 3.14, Fig. 4.13, Fig. 5.12, Fig. 5.13, Fig. 6.4). Estos resultados confirman lo planteado en la hipótesis 7: “*Los cambios en el nivel de dormición del fruto por efecto de cambios en el AM están asociados a cambios en la sensibilidad a la hipoxia de los embriones*”.

Como fue comentado anteriormente, los resultados obtenidos muestran que la dormición del fruto depende del embrión, más particularmente de la sensibilidad al ABA del mismo (Fig. 6.3, Fig. 6.4). En otras palabras, la sensibilidad al ABA del embrión determina la susceptibilidad del mismo a la imposición de la dormición por la presencia de las cubiertas. Sin embargo, las cubiertas por sí mismas también ejercen un efecto, ya que aumentan la sensibilidad al ABA de los embriones a través de la imposición de un estado de hipoxia (Benech-Arnold et al., 2006; Bradford et al., 2008; Mendiondo et al., 2010, Domínguez et al., 2019). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el

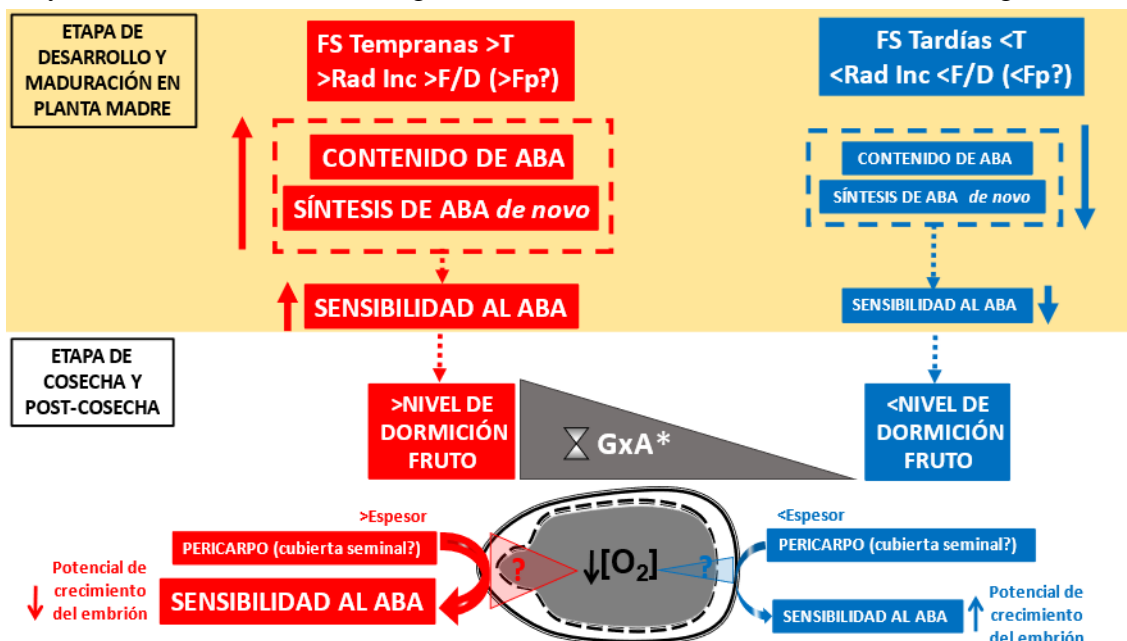


**Fig. 6. 3.** Modelo conceptual de regulación ambiental de la dormición del fruto entero de girasol. El AM determina cambios en el metabolismo del ABA durante el desarrollo del fruto en la planta madre que establece la sensibilidad al ABA de los embriones, mecanismo responsable de mantener el nivel de dormición del fruto durante el almacenaje post-cosecha. Por otro lado, el AM determina cambios en el espesor de las cubiertas y podría determinar cambios en las propiedades químicas de las mismas (i.e. polifenoles). Estos cambios podrían afectar el nivel de hipoxia al que está expuesto el embrión y su sensibilidad al ABA.

AM también estaría modulando el nivel de dormición de los frutos a través de este mecanismo, ya que embriones provenientes de AM asociados a un mayor nivel de dormición de los frutos presentaron un aumento mayor en su sensibilidad al ABA en condiciones de hipoxia (Fig. 3.14, Fig. 4.13, Fig. 5.13, Fig. 6.4). Más allá de los efectos del AM sobre las propiedades anatómicas de las cubiertas observados en esta tesis, y de que las mismas son indispensables para imponer la dormición en el fruto entero cuando los embriones germinan en un alto porcentaje, los resultados obtenidos indican que la dormición del fruto depende mayormente de la fisiología del embrión. Se requieren futuros estudios para poder determinar si existe una relación causal entre los cambios observados en las cubiertas y las variaciones en el nivel de dormición de los frutos.

El AM ejerció un rol diferencial sobre la dormición del fruto explicada por el embrión y sobre aquella explicada por la presencia de las cubiertas. En temperaturas de incubación donde generalmente no se expresa la dormición embrionaria en girasol (25°C), el alto nivel de dormición de los frutos del genotipo 1552 expuestos a mayores temperaturas durante el desarrollo en FS tempranas se explicó por la contribución de las cubiertas, ya que su remoción aumentó significativamente el porcentaje de germinación de los embriones (Fig. 4.10, Fig. 4.11). Por su parte, en el tratamiento testigo de la misma FS (menores temperaturas durante el desarrollo de los frutos; Fig. 4.10, Fig. 4.11), la dormición embrionaria explicó en mayor medida la dormición del fruto entero. Estos resultados nos permiten aceptar la hipótesis 3: “*La temperatura experimentada durante la etapa de desarrollo de los frutos ejerce un efecto diferencial sobre los componentes embrionarios y por cubiertas de la dormición en frutos de girasol*”. En contraposición, en las FS tardías, las diferencias entre tratamientos térmicos se explicaron por la dormición impuesta por las cubiertas, ya que al incubar los embriones aislados de ambos tratamientos se alcanzó un porcentaje de germinación máximo; frutos expuestos a

mayores temperaturas mostraron una mayor dormición explicadas por las cubiertas (Fig. 4.10, Fig. 4.11). Sin embargo, aunque los embriones de ambas FS germinaran completamente en agua, los provenientes de tratamientos de alta temperatura presentaron mayor sensibilidad al ABA (Fig. 4.12), indicando el diferente estado fisiológico de los



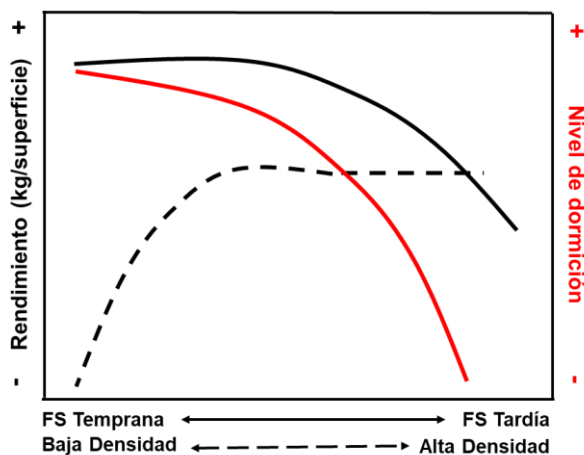
**Fig. 6. 4.** Modelo conceptual de la regulación ambiental de la dormición del fruto de girasol derivado de los resultados obtenidos en esta tesis. Se identifican dos momentos: “Desarrollo y maduración del fruto en la planta madre” (fondo amarillo) y “Cosecha y Post-cosecha” (fondo blanco). El sector rojo indica condiciones del AM que determinan un mayor nivel de dormición del fruto (FS tempranas, alta temperatura y alta relación FD durante el desarrollo del fruto en la planta madre, “AM<sub>MADOR</sub>”), mientras que el sector azul, indica AM que determinan un menor nivel de dormición de los frutos (FS tardías, baja temperatura y baja relación FD, “AM<sub>MEDOR</sub>”). El AM afecta el metabolismo del ABA durante el desarrollo de los frutos y la señalización del ABA. AM<sub>MADOR</sub> presentan un mayor contenido endógeno de ABA de los embriones y una mayor síntesis de ABA durante la incubación de los embriones que determinan una mayor sensibilidad al ABA de los embriones durante el desarrollo tardío. Esta mayor sensibilidad al ABA de los embriones es el principal mecanismo responsable del mayor nivel de dormición de los frutos provenientes de estos AM a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha. En los AM<sub>MEDOR</sub>, se observa el efecto contrario (menor contenido endógeno y síntesis de ABA, menor sensibilidad al ABA de los embriones durante desarrollo tardío, y frutos con menor nivel de dormición a cosecha y durante la post-cosecha). El AM generó cambios anatómicos en el pericarpio. En AM<sub>MADOR</sub> el pericarpio del fruto fue más ancho, mientras que en los AM<sub>MEDOR</sub> fue más fino. Estos cambios anatómicos podrían afectar la difusión de O<sub>2</sub> a través del pericarpio y el nivel de hipoxia al que está sometido el embrión dentro del fruto. El nivel de hipoxia impuesto por las cubiertas aumenta la sensibilidad al ABA de los embriones. Este aumento es, a su vez, afectado por el AM, donde embriones expuestos a AM<sub>MADOR</sub> evidenciaron un mayor aumento en la sensibilidad al ABA en hipoxia que los embriones expuestos a AM<sub>MEDOR</sub>. Los efectos del AM sobre el metabolismo y señalización de ABA de los embriones determinan diferencias en el potencial de crecimiento de los embriones, donde embriones expuestos a AM<sub>MADOR</sub> presentaron un menor potencial de crecimiento que embriones de AM<sub>MEDOR</sub>. El asterisco en el triángulo central señala que los efectos del AM sobre el nivel de dormición de los frutos dependerán de la variación de las condiciones ambientales exploradas por las plantas dadas no solo por la magnitud de la variación en la FS y/o densidad de siembra, sino también por la latitud donde se implanten los cultivos.

mismos y explicando las diferencias en su susceptibilidad a la imposición de la dormición por la presencia de las cubiertas del fruto.

## **6.2. Aporte e implicancias agronómicas de la tesis**

Los resultados reportados en esta tesis demuestran que el AM afecta el nivel de dormición de los frutos de girasol, pero que la magnitud de este efecto depende del genotipo (Fig. 2.1, Fig. 2.2, Fig. 2.3, Fig. S2.1). Las diferencias en dormición entre genotipos fueron más marcadas en FS tempranas que en FS tardías. Esto señala la importancia de producir semillas en condiciones donde se exprese el fenotipo de dormición cuando se persigue el objetivo de discriminar genotipos en función de este carácter (Postma y Ågren, 2015; Edwards et al., 2016; Kerdaffrec y Nordborg, 2017). El conocimiento del efecto del AM sobre el nivel de dormición de los frutos de girasol no sólo ayudará a predecir el nivel de dormición en función de las condiciones ambientales que explora el cultivo durante el desarrollo de los frutos, sino que también, contribuirá positivamente al mejoramiento genético y a la producción de semillas, indicando la mejor ubicación y época del año para aumentar la calidad de las semillas.

En líneas generales, se puede observar que a medida que se atrasa la FS, disminuye el rendimiento (Fig. 6.5, línea negra llena; de la Vega y Hall, 2002a), mientras que éste aumenta conforme se aumenta la densidad de siembra, hasta llegar a un plateau (Fig. 6.5, línea negra punteada, Villalobos et al., 1994). A su vez, como fue demostrado en esta tesis, el atraso en la FS y el aumento en la densidad de siembra disminuyen el nivel de dormición de los frutos (Fig. 6.5, línea roja). Este marco conceptual simple (ya que no se incluye la posible interacción entre FS y densidad y otros efectos sobre la calidad de las semillas, como el calibre) nos permite evaluar decisiones de manejo en relación a la estructura del cultivo que lleven a disminuir el nivel de dormición de los frutos a cosecha.



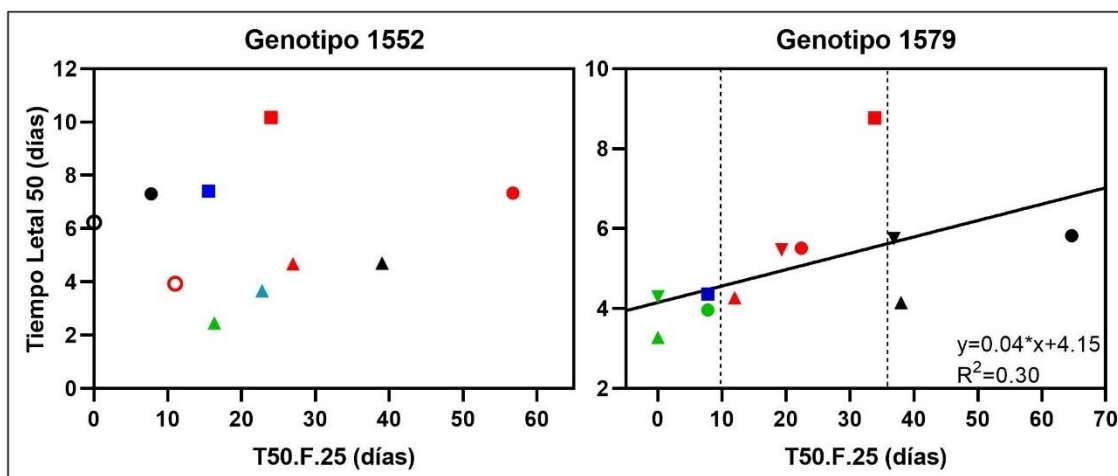
**Fig. 6. 5.** Esquema conceptual de cambios en el rendimiento por superficie (líneas negras) y en el nivel de dormición (línea roja) frente a variaciones en la fecha (línea llena) y densidad de siembra (línea punteada).

Aunque el rendimiento es el objetivo más importante en la mayoría de los sistemas de producción de cultivos, los productores de semilla buscan obtener semillas de alta calidad, es decir, que germinen rápido, de una manera uniforme y en un amplio rango de condiciones ambientales. En este contexto, se pueden plantear dos situaciones contrastantes. Si el objetivo es producir semilla híbrida, se buscará un balance entre rendimiento y calidad de semilla (es decir, baja dormición). Por lo tanto, se podrían sembrar altas densidades en una FS que permita disminuir el nivel de dormición sin provocar disminuciones significativas en el rendimiento (Fig. 2.6, Fig. 6.5). Si el objetivo es regenerar parentales para producir semilla híbrida, donde se busca que la semilla germine rápido y uniforme para poder sincronizar la fenología y así lograr los cruzamientos, se podría sembrar a densidades relativamente altas en fechas más tardías que permitan cosechar lotes de semilla con un menor nivel de dormición. Por último, es importante señalar que los efectos de estas prácticas de manejo sobre el rendimiento y el nivel de dormición de los frutos dependerán de la variación de las condiciones ambientales exploradas por las plantas. Esta variación estará determinada no sólo por la magnitud de la variación en la fecha y/o densidad de siembra, sino también por la latitud donde se implanten los cultivos (los cambios serán más pronunciados en latitudes más altas).

La calidad de un lote de semillas no solo está dada por la capacidad de germinación de las mismas, sino que también depende de la longevidad de las semillas. Durante el almacenamiento de las semillas, ocurre el deterioro y la consecuente pérdida de vigor. El ritmo de este envejecimiento depende del contenido de humedad de la semilla, de la temperatura de almacenaje y de la calidad inicial de las mismas (Walters et al., 2005). Sin embargo, poco se conoce del efecto del AM sobre este atributo de calidad. Por ejemplo, Contreras (2007) encontró que semillas creciendo bajo fotoperíodos largos en la planta madre (como los que se dan, por ejemplo, en FS tempranas) presentaron mayor dormición y mayor longevidad que semillas provenientes de ambientes bajo fotoperíodos cortos. Esto sugiere la posibilidad de que exista una relación positiva entre la longevidad y el nivel de dormición (Tesnier et al., 2002). En este sentido, realizamos un estudio preliminar para determinar el efecto del AM sobre la longevidad de las semillas mediante la realización de un test de envejecimiento acelerado (Fig. 6.6, ver *Notas suplementarias al capítulo 6*). Los resultados obtenidos sugieren que, en ciertos casos, los menores niveles de dormición de los frutos de girasol podrían asociarse a frutos menos longevos, aunque esto dependió del genotipo y del tratamiento aplicado (Fig. 6.6). En el genotipo 1579, frutos que presentaron un menor nivel de dormición producto de FS tardías, tratamiento de Defoliado y AD presentaron menores valores de Tiempo Letal 50 (tiempo que tarda en morir el 50% de la población de semillas). Sin embargo, no parecería haber una asociación clara entre la longevidad y los niveles de dormición entre tratamientos control y de alta relación FD (Desgranado, Raleo y BD), ni en aquellos donde se varió el ambiente térmico (genotipo 1552, Fig. 6.6). Más allá de que los datos presentados no son concluyentes, verificar esta relación sería importante para evaluar medidas de manejo que ayuden a disminuir los niveles de dormición en los lotes de



semillas de girasol sin perjudicar la longevidad de las mismas, ya que es esencial para mantener la calidad de las semillas durante su almacenaje.



**Fig. 6. 6.** Relación entre el tiempo letal 50 (en días, que representa el tiempo en el que las semillas pierden la viabilidad) y el nivel de dormición de frutos incubados a 25°C, por genotipo, para los tratamientos de FS (18/19, cuadrados, rojo FS temprana, azul FS tardía; capítulo 3), temperatura (círculos 1552, llenos FS temprana, vacíos FS tardía, rojo tratamiento alta temperatura, negro tratamiento control; capítulo 4) y FD (triángulos: verde defoliado, rojo control, negro desgranado; círculos 1579: verde AD, rojo raleo y negro BD; capítulo 5). En el anexo se describe brevemente la metodología utilizada para obtener los valores de TL50. La relación entre las dos variables fue significativa ( $p$ -valor $<0.05$ ) en el caso del genotipo 1579.

Como se comentó en distintos pasajes de esta discusión, los resultados obtenidos muestran que la dormición del fruto de girasol depende de la sensibilidad al ABA de los embriones (Fig. 6.2). Esto sugiere que la determinación de la sensibilidad al ABA de los embriones podría ser utilizada en planes de mejoramiento como una metodología sencilla para la selección de genotipos que presenten bajos niveles de dormición o la detección de genotipos problemáticos en relación a este carácter. Para ello se debería desarrollar un test de incubación de embriones en ABA estandarizado y sencillo que permita evaluar un importante número de genotipos en un tiempo razonable con el fin de detectar materiales que puedan ser propensos o no a presentar problemas de dormición.

### **6.3. Investigaciones futuras**

Los resultados presentados en esta tesis resultan un avance significativo en el entendimiento de la regulación ambiental de la dormición en frutos de girasol, y de los mecanismos fisiológicos involucrados en dicha regulación. A su vez, los resultados obtenidos tienen fuertes implicancias agronómicas en relación al manejo de los cultivos (fecha y densidad de siembra) para obtener semillas de girasol con menores niveles de dormición a cosecha. Más allá de estos aportes al conocimiento, al análisis de los resultados también deja interrogantes planteados que pueden ser el punto de partida de futuras investigaciones. En relación a las implicancias agronómicas de los resultados, en futuros estudios se deberían evaluar los efectos de la interacción entre FS y densidad de siembra sobre el nivel de dormición de los frutos con el objetivo de poder dar una recomendación agronómica más certera que permita disminuir esta problemática en los sistemas de producción de semilla híbrida en este cultivo. Asimismo, más allá de que los resultados de esta tesis dan indicios claros de los factores ambientales que podrían estar determinando los cambios en el nivel de dormición de los frutos como consecuencia de cambios en la FS, no estaba dentro de sus objetivos identificar y cuantificar el efecto relativo de los factores involucrados. Por lo tanto, se requerirán futuras investigaciones que cuantifiquen el impacto de cada variable ambiental en forma individual y combinada (ensayos de interacción entre factores) sobre la dormición de los frutos para poder develar esta incógnita.

En relación a los mecanismos involucrados en la regulación de la dormición por el AM, en esta tesis se avanzó en la comprensión de los mecanismos asociados a la vía del ABA (metabolismo y señalización), ya que las evidencias muestran que esta hormona es clave en la regulación de la dormición en la mayoría de las especies estudiadas (Bewley et al., 2013). Sin embargo, no se estudió en suficiente detalle la posible interacción del

ABA con otras hormonas relevantes en el control hormonal de la dormición, como GAs, etileno y ácido jasmónico (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Feurtado y Kermode, 2007; Vigliocco et al., 2007; Finkelstein et al., 2008; Matilla y Matilla-Vázquez, 2008; Llanes et al., 2015). Sería interesante conocer, por ejemplo, las variaciones en los niveles endógenos y/o de síntesis de estas hormonas en función de cambios en el AM y su efecto sobre la dormición del fruto; en esta tesis no se verificaron cambios significativos en la sensibilidad de los embriones a las mismas (Fig. 3.3, Fig. 3.4, Fig. 4.7, Fig. 5.4, Fig. S3.2, Fig. S3.3, Fig. S3.5, Fig. S4.1).

Los cambios en los contenidos y en la sensibilidad a las hormonas están precedidos por cambios en los niveles de expresión de genes que codifican para estas hormonas. Por lo tanto, en futuras investigaciones sería un gran aporte conocer los niveles de expresión de genes de metabolismo de ABA (síntesis: *HaABA1*, *HaABA2*, *HaNCED2* y *HaNCED4*; degradación: *HaCYP707A1*, *HaCYP707A2*, *HaCYP707A3*), de señalización de ABA (*HaSnRKs1*, *HaSnRKs2*, *HaHAB1*, *HaHAB2*, *HaABI2*, *HaABI3*, *HaABI5*), de metabolismo de GAs (síntesis *HaGA3ox1*; degradación *HaGA2ox*), y de síntesis de etileno (*HaACO*) (Xia et al., 2019). Asimismo, sería interesante poder medir el gen de tiempo a floración MFT y el de retraso en la germinación (DOG) en AM diferenciales. Existen extensas relaciones cruzadas entre las vías de germinación y del tiempo a floración. El MFT actúa en el control de la dormición de semillas de *Arabidopsis* en una compleja red de genes que incluye, entre otros genes, al ABI5 (de señalización del ABA; Dave et al., 2016), además de estar relacionado con las propiedades de la cubierta de la semilla (Chen et al., 2014). Por su parte, DOG1 interfiere con la señalización de ABA, promoviendo la dormición de semillas (Dekkers et al., 2016; Née et al., 2017). Asimismo, la temperatura durante la maduración de semillas de *Arabidopsis* altera los niveles de transcripción de DOG1 en las semillas

maduras, afecta la expresión del gen CYP707A2 (degradación de ABA) y los niveles de ABA y GAs (Chiang et al., 2011; Kendall et al., 2011).

Los resultados de esta tesis evidenciaron que las cubiertas del fruto imponen la dormición al embrión a través de un estado de hipoxia que aumenta la sensibilidad del embrión al ABA (Fig. 3.14, Fig. 4.13, Fig. 5.13, Fig. 6.3, Fig. 6.4). Esta regulación podría ser modificada por el AM a través de los cambios estructurales que se observaron en las cubiertas (Fig. 3.15, Fig. 5.14, Fig. 6.4), que podrían determinar cambios en la difusión del O<sub>2</sub> al embrión. Sin embargo, aún no se conoce si los cambios estructurales en el pericarpo provocados por el AM determinan diferencias en la capacidad de difusión de O<sub>2</sub> de las cubiertas del fruto y, por consiguiente, si esto afecta el nivel de hipoxia al que está sometido el embrión. Estas determinaciones serían claves para un mayor entendimiento de cómo está regulada la dormición en el fruto de girasol por el AM. Por otra parte, la restricción de oxígeno al embrión podría deberse a la oxidación de compuestos fenólicos en las cubiertas, mediada por la actividad de la enzima polifenol oxidasa, como ocurre en cebada (Lenoir et al., 1986). Aunque en girasol estudios preliminares no encontraron una asociación entre los cambios en el nivel de dormición debido a tratamientos de sombreado durante el desarrollo del fruto y el contenido de fenoles de las cubiertas (*Pizzorno, comunicación personal*), futuras investigaciones deberían evaluar esta posibilidad en un mayor número de genotipos y ante la variación de otros factores del AM.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguirrezábal LA, Lavaud Y, Dosio GA, Izquierdo NG, Andrade FH, González LM. 2003.** Weight per seed and oil concentration in a sunflower hybrid are accounted for by intercepted solar radiation during a definite period of seed filling. *Crop Science*, 43:153–161.
- Aguirrezábal L, Pereyra V. 1998.** Girasol. In L. Aguirrezábal and F. Andrade (ed.) *Calidad de productos agrícolas: Bases ecofisiológicas, genéticas y de manejo agronómico*. Unidad Integrada Balcarce, Argentina.
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet, Sotta B, Grappin P, 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*, 219:479–488.
- Allen PS, Benech-Arnold RL, Batlla D, Bradford KJ. 2007.** Modeling of seed dormancy. En Bradford, K.J. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. 72-112.
- Andrade FH. 1995.** Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. *Field Crops Research*, 41, 1–12.
- Andrade AM, Riera NV, Lindström LI, Alemano SG, Alvarez D, Abdala GI, Vigliocco AE. 2015.** Pericarp anatomy and hormone profiles of cypselas in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. *Plant biology*, 17(2), 351–360.
- Andrianasolo FN, Champolivier L, Mauryc P, Debaeke P. 2017.** Analysis of source and sink dynamics involved in oil and protein accumulation in sunflower achenes using a bi-linear model. *Field Crops Research*, 201, 200–209.
- Angeloni P, Aguirrezábal L, Echarte MM. 2021.** Assessing the mechanisms underlying sunflower grain weight and oil content responses to temperature during grain filling. *Field Crops Research*, 262, 108040.
- Arana MV, González-Polo M, Martínez-Meier A, Gallo LA, Benech-Arnold RL, Sánchez RA, Batlla D. 2016.** Seed dormancy responses to temperature relate to *Nothofagus* species distribution and determine temporal patterns of germination across altitudes in Patagonia. *New Phytologist*, 209, 507–520.
- Arata GJ, Riveira-Rubin MA, Batlla D, Rodríguez MR. 2021.** Dormancy attributes in Sunflower achenes (*Helianthus annuus* L.): I. Intraspecific variability. *Crop Science*, 1–16.
- Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L, Marion-Poll A. 2013.** ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4, 63.
- Argyris J, Dahal P, Hayashi E, Still DW, Bradford KJ. 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.
- Bailly C, Leymarie J, Rousseau S, Côme D, Feutry A, Corbineau F. 2003.** Sunflower Seed Development as Related to Antioxidant Enzyme Activities, pp 69-75, in Nicolás G, Bradford KJ, Côme D, Pritchard HW (ed.). *The biology of Seeds: Recent Research Advances*. Wallingford, UK.
- Balalić I, Zorić M, Brankovic G, Terzić S, Crnobarac J. 2012.** Interpretation of hybrid × sowing date interaction for oil content and oil yield in sunflower. *Field Crops Research*, 137, 70-77.
- Bange MP, Hammer GL, Rickert KG. 1998.** Temperature and sowing date affect the linear increase of sunflower harvest index. *Agronomy Journal*, 90, 324-328.
- Barberon M, Vermeer JE, De Bellis D, Wang P, Naseer S, Andersen TG, Humbel BM, Nawrath C, Takano J, Salt DE. 2016.** Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell*, 164, 447–459.
- Barr HD, Weatherley PE. 1962.** A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, 15(3), 413-428.
- Barrero JM, Porfirio L, Hughes T, Chen J, Dillon S, Gubler F, Ral JPF. 2020.** Evaluation of the impact of heat on wheat dormancy, late maturity  $\alpha$ -amylase and grain size under controlled conditions in diverse germplasm. *Scientific Reports*, 10, 17800.

- Barrero JM, Jacobsen JV, Talbot MJ, White RG, Swain SM, Garvin DF, Gubler F. 2012.** Grain dormancy and light quality effects on germination in the model grass *Brachypodium distachyon*. *New Phytologist*, 193(2), 376–386.
- Barrero JM, Talbot MJ, White RG, Jacobsen JV, Gubler F. 2009.** Anatomical and transcriptomic studies of the coleorhiza reveal the importance of this tissue in regulating dormancy in barley. *Plant Physiology*, 150(2), 1006–21.
- Barros JFC, de Carvalho M, Baschab G. 2004.** Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to sowing date and plant density under Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy*, 21(3), 347–356.
- Barthe P, Garello G, Bianco-Trinchant J, Le Page-Degivry MT. 2000.** Oxygen availability and ABA metabolism in *Fagus sylvatica* seeds. *Plant Growth Regulation*, 30, 185–191.
- Baskin JM, Baskin CC. 2004.** A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14, 1–16.
- Batlla D, Benech-Arnold RL. 2015.** A framework for the interpretation of temperature effects on dormancy and germination in seed populations showing dormancy. *Seed Science Research*, 25, 147–158.
- Batlla D, Grundy A, Dent KC, Clay HA, Finch-Savage WE. 2009.** A quantitative analysis of temperature-dependent dormancy changes in *Polygonum aviculare* seeds. *Weed Research*, 49, 428–438.
- Benech-Arnold RL, Gualano N, Leymarie J, Côme D, Corbineau F. 2006.** Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *Journal of experimental botany*, 57, 1423–1430.
- Benech-Arnold RL. 2004.** Inception, maintenance, and termination of dormancy in grain crops: Physiology, genetics, and environmental control. En: Benech-Arnold, R.L. y Sánchez, R.A., eds., *Handbook of seed physiology: Applications to agriculture*. Food Products Press, New York, USA. p. 169–198.
- Benech-Arnold RL, Enciso S, Sánchez RA, Rodríguez MV. 2003.** On the hormonal nature of the stimulatory effect of high incubation temperatures on germination of dormant sorghum (*S. bicolor*) caryopses. *New Phytologist*, 160, 371–377.
- Benech-Arnold RL, Sánchez RA, Forcella F, Kruk BC, Ghersa CM. 2000.** Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research*, 67, 105–122.
- Benech-Arnold RL, Giallorenzi MC, Frank J, Rodríguez MV. 1999.** Termination of hull-imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. *Seed Science Research*, 9, 39–47.
- Benech-Arnold RL, Kristof G, Steinbach HS, Sánchez R. 1995.** Fluctuating temperatures have different effects on embryonic sensitivity to ABA in Sorghum varieties with contrasting preharvest sprouting susceptibility. *Journal of Experimental Botany*, 46, 711–717.
- Benech-Arnold RL, Fenner M, Edwards PJ. 1992.** Changes in dormancy level in *Sorghum halepense* seeds induced by water stress during seed development. *Functional Ecology*, 6, 596–605.
- Benech-Arnold RL, Fenner M, Edwards PJ. 1991.** Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* induced by water stress during grain filling. *New Phytologist*, 118, 339–347.
- Berzsenyi Z, Dang QL, Micskei G, Takács N. 2006.** Effect of sowing date and N fertilisation on grain yield and photosynthetic rates in maize (*Zea mays* L.). *Cereal Research Communications*, 34(1), 409–412.
- Bethke PC, Libourel IGL, Aoyama N, Chung YY, Still DW, Jones RL. 2007.** The *Arabidopsis* Aleurone Layer Responds to Nitric Oxide, Gibberellin, and Abscisic Acid and Is Sufficient and Necessary for Seed Dormancy. *Plant Physiology*, 143(3), 1173–1188.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HW, Nonogaki H. 2013.** *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. Springer Science+Business Media, LLC. 392p.
- Bewley JD. 1997.** Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9, 1055–1066.
- Bianco J, Garello G, Le Page-Degivry MT. 1994.** Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. *Seed Science Research*, 4, 57–62.

- Biddulph T, Plummer J, Setter T, Mares D. 2007.** Influence of high temperature and terminal moisture stress on dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, 103, 139-153.
- Bodrone P, Rodríguez MV, Arisnabarreta S, Batlla D. 2017.** Maternal environment and dormancy in sunflower: The effect of temperature during fruit development. *European Journal of Agronomy*, 82, 93-103.
- 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 post-cosecha. Magíster en Producción Vegetal. EPG-FAUBA.
- Borisjuk L, Rolletschek H. 2009.** The oxygen status of the developing seed. *New Phytologist*, 182, 17-30.
- Borrás L, Slafer GA, Otegui ME. 2004.** Seed dry weight response to source–sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *Field Crops Research*, 86(2-3), 131-146.
- Bradford KJ, Benech-Arnold RL, Côme D, Corbineau F. 2008.** Quantifying the sensitivity of barley seed germination to oxygen, abscisic acid, and gibberellin using a population-based threshold model. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 335–347.
- 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.
- Cantagallo JE, Medan D, Hall AJ. 2004.** Grain number in sunflower as affected by shading during floret growth, anthesis and grain setting. *Field Crops Research*, 85, 191–202.
- Cantagallo J, Hall AJ. 2002.** Seed number in sunflower as affected by light stress during the floret differentiation interval. *Field Crops Research*, 74, 73-181.
- Cantamutto M, Presotto A, Fernández Moroni I, Alvarez D, Poverene M, 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.
- Ceccato D, Bertero D, Batlla D, Galati B. 2015.** Structural aspects of dormancy in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): importance and possible action mechanisms of the seed coat. *Seed Science Research*, 25, 267-275.
- Ceccato D, Bertero D, Batlla D. 2011.** Environmental control of dormancy in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds: two potential genetic resources for pre-harvest sprouting tolerance. *Seed Science Research*, 21, 133-141.
- Chazarreta YD, Amas JI, Cirilo AG, Otegui ME. 2018.** Llenado y secado del grano en híbridos de maíz liberados entre 1980 y 2016: Efectos de la fecha de siembra. *Comunicacion INTA, RTA/Vol10/N°38*.
- Chen X, Yoong FY, O'Neill CM, Penfield S. 2021.** Temperature during seed maturation controls seed vigour through ABA breakdown in the endosperm and causes a passive effect on DOG1 mRNA levels during entry into quiescence. *New Phytologist*, 232(3), 1311-1322.
- Chen F, Zhou W, Yin H, Luo X, Chen W, Liu X, Wang X, Meng Y, Feng L, Qin Y, Zhang C, Yang F, Yong T, Wang W, Liu J, Du J, Liu W, Yang W, Shu K. 2020.** Shading of the mother plant during seed development promotes subsequent seed germination in soybean. *Journal of Experimental Botany*, 71 (6), 2072–2084.
- Chen M, Macgregor DR, Dave A, Florance H, Moore K, Paszkiewicz K, Smirnoff N, Graham IA, Penfield S. 2014.** Maternal temperature history activates Flowering Locus T in fruits to control progeny dormancy according to time of year. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 18787–18792.
- Chiang GC, Bartsch M, Barua D, Nakabayashi K, Debieu M, Kronholm I, Koornneef M, Soppe WJ, Donohue K, De Meaux J. 2011.** DOG1 expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular ecology*, 20(16), 3336-49.
- Chimenti C, Hall AJ, Lopez M. 2001.** Embryo-growth rate and duration in sunflower as affected by temperature. *Field Crops Research*, 69, 81–88.

- Connor DJ, Hall AJ. 1997.** Sunflower physiology. In: Schneiter, A.A. (Ed.), Sunflower Technology and Production. Agron. Monogr. 35. ASA, CSSA & SSSA, Madison, WI, USA, pp. 113–182.
- Contreras S, Bennett M, Tay D. 2009.** Temperature during seed development affects weight, germinability and storability of lettuce seeds. *Seed Science and Technology*, 37, 398–412.
- Contreras S. 2007.** Effects of maternal plant environment on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed dormancy, germinability and storability. Dissertation presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in the Graduate School of The Ohio State University.
- Corbineau F, Xia Q, Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H. 2014.** Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Frontiers in Plant Science*, 5, 539.
- Corbineau F, Rudnicki R, Côme D. 2006.** Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by high temperature. Possible involvement of ethylene biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 73, 368–373.
- Corbineau F, Bianco J, Garello G, Côme D. 2002.** Breakage of *Pseudotsuga menziesii* seed dormancy by cold treatment as related to change in seed ABA sensitivity and ABA level. *Physiologia plantarum*, 114, 313–319.
- Corbineau F, Benamar A, Côme D. 2000.** Changes in sensitivity to abscisic acid of the developing and maturing embryo of two wheat cultivars with different sprouting susceptibility. *Israel Journal of Plant Sciences*, 48, 189–197.
- Corbineau F, Côme D. 1995.** Control of seed germination and dormancy by the gaseous environment. En: Kigel, J. y Galili, G., eds., Seed development and germination. CRC Press. p. 397–424.
- Corbineau F, Bagniol S, Côme D. 1990.** Sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed dormancy and its regulation by ethylene. *Israel Journal of Botany*, 39, 313–325.
- Corbineau F, Rudnicki R, Côme D. 1989.** ACC conversion to ethylene by sunflower seeds in relation to maturation germination and thermodormancy. *Plant Growth Regulation*, 8, 105–115.
- Corbineau F, Rudnicki RM, Côme D. 1988.** Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by high temperature. Possible involvement of ethylene biosynthesis. *Physiologia plantarum*, 73, 368–373.
- Cutler AJ, Rose PA, Squires TM, Loewen MK, Shaw AC. 2000.** Inhibitors of abscisic acid 8'-hydroxylase. *Biochemistry*, 39, 13614–13624.
- d'Andria R, Chiaranda FQ, Magliulo V, Mori M. 1995.** Yield and soil water uptake of sunflower sown in spring and summer. *Agronomy Journal*, 87, 1122–1128.
- de la Vega AJ, Hall AJ. 2002b.** Effects of planting date, genotype, and their interaction on sunflower yield. II. Components of oil yield. *Crop Science*, 42, 1202–1210.
- de la Vega AJ, Hall AJ. 2002a.** Effects of planting date, genotype, and their interaction on sunflower yield. I. Determinants of oil-corrected grain yield. *Crop Science*, 42, 1191–1201.
- de la Vega AJ, Chapman SC, Hall AJ. 2001.** Genotype by environment interaction and indirect selection for yield in sunflower. I. Two-mode pattern analysis of oil and biomass yield across environments in Argentina. *Field Crops Research*, 72, 17–38.
- Dave A, Vaistij FE, Gilday AD, Penfield SD, Graham IA. 2016.** Regulation of *Arabidopsis thaliana* seed dormancy and germination by 12-oxo-phytodienoic acid. *Journal of Experimental Botany*, 67(8), 2277–2284.
- Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M. 2000.** Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122, 403–414.
- Dekkers B, He H, Hanson J, Willems L, Jamar D, Cueff G, Rajjou L, Hilhorst H, Bentsink L. 2016.** The *Arabidopsis* Delay of Germination 1 gene affects Abscisic Acid Insensitive 5 (ABI5) expression and genetically interacts with ABI3 during *Arabidopsis* seed development. *The Plant journal*, 85(4).
- Deregibus VA, Casal JJ, Jacobo EJ, Gibson D, Kauffman M, Rodríguez AM. 1994.** Evidence that heavy grazing may promote the germination of *Lolium multiflorum* seeds via phytochrome-mediated perception of high red/far-red ratios. *Functional Ecology*, 8, 536–542.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. 2012.** InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.



- Domínguez CP, Rodríguez MV, Batlla D, García de Salamone IE, Mantese AI, Andreani AL, Benech-Arnold RL. 2019.** Sensitivity to hypoxia and microbial activity are instrumental in pericarp-imposed dormancy expression in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Seed Science Research*, 1–12.
- Domínguez CP, Batlla D, Rodríguez MV, Windauer LB, Gerbaldo M, Benech-Arnold RL. 2016.** Pericarp-Imposed Dormancy in Sunflower: Physiological Basis, Impact on Crop Emergence, and Removal at an Industrial Scale. *Crop Science*, 56, 716–726.
- Donohue K, Heschel MS, Butler CM, Barua D, Sharrock RA, Whitelam GC, Chiang GCK. 2008.** Diversification of phytochrome contributions to germination as a function of seed maturation environment. *The New Phytologist*, 177, 367–379.
- Donohue K, Dorn L, Griffith C, Kim E, Aguilera A, Polisetty CR, Schmitt J. 2005.** Environmental and genetic influences on the germination of *Arabidopsis thaliana* in the field. *Evolution*, 59, 740–757.
- Dorne CJ. 1981.** Variation in seed germination inhibition of *Chenopodium bonus-henricus* in relation to altitude of plant growth. *Canadian Journal of Botany*, 59, 1893–1901.
- Dosio GAA, Aguirrezábal LAN, Andrade FH, Pereyra VR. 2000.** Solar radiation intercepted during seed filling and oil production in two sunflower hybrids. *Crop Science*, 40, 1637-1640.
- Edwards BR, Burghardt LT, Zapata-García M, Donohue K. 2016.** Maternal temperature effects on dormancy influence germination responses to water availability in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 126, 55-67.
- Fedi F, O'Neill CM, Menard G, Trick M, Dechirico S, Corbineau F, Bailly C, Eastmond PJ, Penfield S. 2017.** Awake1, an ABC-Type Transporter, Reveals an Essential Role for Suberin in the Control of Seed Dormancy. *Plant Physiology*, 174(1), 276–283.
- Fenner M. 1991.** The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Science Research*, 1, 75–84.
- Fernández Farnocchia RB, Benech-Arnold RL, Mantese A, Batlla D. 2021.** Optimization of timing of next-generation emergence in *Amaranthus hybridus* is determined via modulation of seed dormancy by the maternal environment, *Journal of Experimental Botany*, 72(12), 4283–4297.
- Fernández Farnocchia RB. 2020.** Efecto del ambiente materno sobre el nivel de dormición y los patrones temporales de emergencia de dos especies maleza primavera-estivales: *Polygonum aviculare* L. y *Amaranthus hybridus* L. Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias. EPG-FAUBA.
- Fernández Farnocchia RB, Benech-Arnold RL, Mantese A, 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, 4793–4806.
- Feurtado J, Kermode A. 2007.** A Merging of Paths: Abscisic Acid and Hormonal Cross-Talk in the Control of Seed Dormancy Maintenance and Alleviation. *Annual Plant Reviews*, Vol. 27, Seed Development, Dormancy and Germination. 27. 176 - 223.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006.** Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171, 501-523.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008.** Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 387- 415.
- 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.
- Footitt S, Finch-Savage WE. 2017.** Dormancy and Control of Seed Germination. In: Clemens S. (eds) *Plant Physiology and Function*. The Plant Sciences, vol 6. Springer, New York, NY.
- Franchini M, Hernández L, Lindström L. 2010.** Desarrollo de la cutícula y ceras epicuticulares en el pericarpo de girasol (*Helianthus annuus* L.) bajo déficit hídrico moderado en condiciones de campo. *Phyton*. vol 72, n 2, 153-161.
- Frascaroli E, Casarini E, Conti S. 2005.** Response of maize inbred lines to a defoliation treatment inducing tolerance to cold at germination. *Euphytica*, 145, 295–303.
- Frey A, Godin B, Bonnet M, Sotta B, Marion-Poll A. 2004.** Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 218, 958–964.

- Gabriel KR. 1971.** The biplot-graphical display of matrices with applications to principal component analysis. *Biometrika*, 58, 453–467.
- Gallagher RS, Granger KL, Snyder AM, Pittmann D, Fuerst EP. 2013.** Implications of Environmental Stress during Seed Development on Reproductive and Seed Bank Persistence Traits in Wild Oat (*Avena fatua* L.). *Agronomy*, 3, 537-549.
- Garello G, Le Page-Degivry M. 1999.** Evidence for the role of abscisic acid in the genetic and environmental control of dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Seed Science Research*, 9(3), 219-226.
- Gay G, 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, 193–200.
- González SN, Viega LM, Beretta A, Córdoba MA, Rossi CA. 2019.** Efecto de la temperatura y la precipitación durante el llenado de grano sobre la dormición y sensibilidad al agua en granos de cebada (*Hordeum vulgare* L.). *Agriscientia*, 36(2), 19-27.
- Grappin P, Bouinot D, Sotta B, Miginiac E, Jullien M. 2000.** Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta*, 210, 279-285.
- Gu X, Liu T, Feng J, Suttle J, Gibbons J. 2010.** The qSD12 underlying gene promotes abscisic acid accumulation in early developing seeds to induce primary dormancy in rice. *Plant molecular biology*, 73, 97-104.
- Gu X, Kianian SF, Foley ME. 2006.** Dormancy genes from weedy rice respond divergently to seed development environments. *Genetics*, 172, 1199–1211.
- Gualano N, Del Fueyo P, Benech-Arnold RL. 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.
- Gualano NA, Benech-Arnold RL. 2009.** Predicting pre-harvest sprouting susceptibility in barley: looking for “sensitivity windows” to temperature throughout grain filling in various commercial cultivars. *Field Crops Research*, 114, 35-44.
- Gualano N, Carrari F, Rodríguez MV, Pérez-Flores M, Sánchez RA, Iusem N, Benech-Arnold RL. 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.
- Gutterman Y. 2000.** Maternal effects on seeds during development. *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities* (EM Fenner, Ed.). Wallingford: CAB International.
- Gutterman Y. 1992.** Maturation dates affecting the germinability of *Lactuca serriola* L. achenes collected from a natural population in the Negev Desert highlands: germination under constant temperatures. *Journal of Arid Environments*, 22, 353–362.
- Gutterman Y. 1980/81.** Influences on seed germinability: Phenotypic maternal effects during seed maturation. *Israel Journal of Botany*, 29, 105-117.
- Gutterman Y. 1974.** The influence of the photoperiodic regime and red-far red-light treatments of *Portulaca oleracea* L. plants on the germinability of their seeds. *Oecologia*, 17, 27-38.
- He H, de Souza Vidigal D, Basten Snoek L, Schnabel S, Nijveen H, Hilhorst H, Bentsink L. 2014.** Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65, 6603–6615.
- Hernández F, Poverene M, Garayalde A, 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*, 21, 2599–2612.
- Hernández F, Lindström LI, Parodi E, Poverene M, 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.
- Hilhorst HWM. 2007.** Definitions and hypotheses of dormancy. In: Bradford KJ, Nonogaki H (eds) *Seed development, dormancy and germination*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 50–71.
- Hilhorst HWM. 1995.** A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5, 61-73.

- Hilhorst HWM, Smitt AI, Karssen CM. 1986.** Gibberellin-biosynthesis and - sensitivity mediated stimulation of seed germination of *Sisymbrium officinale* by red light and nitrate. *Physiologia Plantarum*, 67, 285-290.
- Huo H, Bradford K. 2015.** Molecular and hormonal regulation of thermoinhibition of seed germination. In *Advances in Plant Dormancy*; Anderson, J., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, pp. 3–33.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2018.** Global warming of 1.5 °C 2018. Cambridge, UK & New York: Cambridge University Press.
- Izquierdo N, Dosio G, Cantarero M, Lujan J, Aguirrezábal L. 2008.** Weight per Grain, Oil Concentration, and Solar Radiation Intercepted during Grain Filling in Black Hull and Striped Hull Sunflower Hybrids. *Crop Science*, 48(2).
- Jacobsen SE, Jørnsgård B, Christiansen JL, Stølen O. 1999.** Effect of harvest time, drying technique, temperature and light on the germination of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Seed Science and Technology*, 27: 937-944.
- Jones RJ, Brenner ML. 1987.** Distribution of Abscisic Acid in Maize Kernel during Grain Filling. *Plant Physiology*, 83(4), 905-909.
- Karssen CM, Zagorski S, Kepczynski J, Groot SPC. 1989.** Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany*, 63, 71-80.
- Karssen CM, Brnjchorst-Van der Sawn DLC, Breekland AE, Koornneef M. 1983.** Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Planta*, 157, 158-65.
- Karssen CM. 1970.** The light promoted germination of the seeds of *Chenopodium album* L. III. Effects of the photoperiod during growth and development of the plants on the dormancy of the produced seeds. *Acta Botanica Neerlandica*. 19: 81-94.
- Kassambara A, Mundt F. 2017.** Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.5.
- Kawakami N, Miyake Y, Noda K. 1997.** ABA insensitivity and low ABA levels during seed development of non-dormant wheat mutants. *Journal of Experimental Botany*, 48(7), 1415–1421.
- Keigley PJ, Mullen RE. 1986.** Changes in soybean seed quality from high temperature during seed fill and maturation. *Crop Science*, 26, 1212-1216.
- Kendall S, Hellwege A, Marriot P, Whalley C, Graham I, Penfield S. 2011.** Induction of Dormancy in *Arabidopsis* Summer Annuals Requires Parallel Regulation of DOG1 and Hormone Metabolism by Low Temperature and CBF Transcription Factors. *The Plant cell*, 23, 2568-80.
- Kerdaffrec E, Nordborg M. 2017.** The maternal environment interacts with genetic variation in regulating seed dormancy in Swedish *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 12(12): e0190242.
- Kermode A. 2005.** Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24, 319-344.
- Kigel J, Ofir M, Koller D. 1977.** Control of the germination responses of *Amaranthus retroflexus* L. seeds by their parental photothermal environment. *Journal of Experimental Botany*, 28, 1125-1136.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. 2002.** Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 33–36.
- Koornneef M, Hanhart CJ, Hilhorst HWM, Karssen CM. 1989.** In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 90(2), 463-9.
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ. 1998.** (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiology*, 118, 849–860.
- Kruk BC, Benech-Arnold RL. 1998.** Functional and quantitative analysis of seed thermal responses in prostrate knotweed (*Polygonum aviculare*) and common purslane (*Portulaca oleracea*). *Weed Science*, 46, 83–90.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005.** Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15, 281–307.
- Lacey EP, Smith S, Case AL. 1997.** Parental effects on seed mass: seed coat but not embryo/endosperm effects. *American Journal of Botany*, 84, 1617–1620.

- Lachabrouilli AS, Rigal R, Corbineau F, Bailly C. 2021.** Effects of agroclimatic conditions on sunflower seed dormancy at harvest. *European Journal of Agronomy*, 124, 126209.
- Le Page-Degivry MT, Bianco J, Barthe P, Garello G. 1996.** Changes in hormone sensitivity in relation to onset and breaking of sunflower embryo dormancy. *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Cab International. 15: 221-231.
- Le Page-Degivry MT, 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 MT, Barthe P, Garello G. 1990.** Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus*. *Plant Physiology*, 92, 1164-1168.
- Lee KP, Piskurewicz U, Turecková V, Strnad M, López-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.
- Lenoir C, Corbineau F, Côme D. 1986.** Barley (*Hordeum vulgare*) seed dormancy as related to glumella characteristics. *Plant Physiology*, 68, 301-307.
- Leubner G. 2002.** Seed after-ripening and over-expression of class I beta-1,3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta*, 215, 959-68.
- Lindström LI, Hernández LF. 2015.** Developmental morphology and anatomy of the reproductive structures in sunflower (*Helianthus annuus*): a unified temporal scale. *Botany*. 93(5): 307-316.
- Lindström L, Pellegrini C, Hernández L. 2007.** Histological development of the sunflower fruit pericarp as affected by pre- and early post-anthesis canopy shading. *Field Crops Research*, 103, 229-238.
- Llanes A, Andrade A, Masciarelli O, Alemano S, Luna M. 2015.** Drought and salinity alter endogenous hormonal profiles at the seed germination phase. *Seed Science Research*, 26(1), 1-13.
- López Pereira M, Berney A, Hall A, Trápani N. 2008.** Contribution of pre anthesis photoassimilates to grain yield: its relationship with yield in Argentine sunflower cultivars released between 1930 and 1995. *Field Crops Research*, 105(1-2), 88-96.
- López Pereira M, Trápani N, Sadras VO. 2000.** Genetic improvement of sunflower in Argentina between 1930 and 1995: Part III. Dry matter partitioning and grain composition. *Field Crops Research*, 67(3), 215-221.
- López Pereira M, Trápani N, Sadras VO. 1999.** Genetic improvement of sunflower in Argentina between 1930 and 1995. II. Phenological development, growth and source-sink relationship. *Field Crops Research*, 63:247-254.
- López-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua NH. 2002.** ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA dependent growth arrest during germination. *The Plant Journal*, 32, 317-328.
- Lunn Major BJ, Kettlewell PS, Scott RK. 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, Kendall S, Florance H, Fedi F, Moore K, Paszkiewicz K, Smirnoff N, Penfield S. 2015.** Seed production temperature regulation of primary dormancy occurs through control of seed coat phenylpropanoid metabolism. *New Phytologist*, 205, 642-652.
- Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M, Hornik K. 2018.** Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.0.7-1
- Maiti R, Vidyasagar P, Shahapur S, Ghosh SK, Seiler GL. 2006.** Development and Standardization of a Simple Technique for Breaking Seed Dormancy in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *HELIA*, 29(45), 117-126.
- Matilla A, Matilla-Vázquez M. 2008.** Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Science*, 175, 87-97.
- Maun MA, Cavers PB. 1971.** Seed production and dormancy in *Rumex crispus*. I. The effects of removal of cauline leaves at anthesis. *Can. J. Bot.*, 49, 1123-1130.
- Mendiondo GM, Leymarie J, Farrant JM, Corbineau F, Benech-Arnold RL. 2010.** Differential expression of abscisic acid metabolism and signalling genes induced by seed-covering structures or hypoxia in barley (*Hordeum vulgare* L.) grains. *Seed Sci. Res.*, 20, 69-77.

- Michel BE. 1983.** Evaluation of the Water potentials of solutions of Polyethylene Glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant physiology*, 72(1), 66–70.
- Mira S, Veiga-Barbosa L, Pérez-García F. 2019.** Seed dormancy and longevity variability of *Hirschfeldia incana* L. during storage. *Seed Science Research*, 29(2), 97-103.
- Motulsky HJ. 2003.** GraphPad Prism Statistics Guide-Statistical Analyses for Laboratory and Clinical Researchers. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA. [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)
- Nambara E, Marion-Poll A. 2003.** ABA action and interactions in seeds. *Trends in plant science*. 8: 213-217.
- Née G, Kramer K, Nakabayashi K, Yuan B, Xiang Y, Miatton E, Finkemeier I, Soppe WJJ. 2017.** DELAY OF GERMINATION1 requires PP2C phosphatases of the ABA signalling pathway to control seed dormancy. *Nature Communications*, 8, 72.
- Ni BR, Bradford KJ. 1993.** Germination and Dormancy of Abscisic Acid- and Gibberellin-Deficient Mutant Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Seeds. Sensitivity of Germination to Abscisic Acid, Gibberellin, and Water Potential. *Plant Physiology*, 101, 607-617.
- Nonogaki, H. (2006).** Seed Germination—The Biochemical and Molecular Mechanisms. *Breeding Science*, 56(2), 93–105.
- Penfield S, MacGregor DR. 2017.** Effects of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* 68: 819–825.
- Peterson BG, Carl P. 2019.** PerformanceAnalytics: Econometric Tools for Performance and Risk Analysis. R package version 1.5.3.
- Pizzorno L. 2021.** El efecto del fotoperiodo y la radiación sobre el nivel de dormición a cosecha en frutos de girasol (*Helianthus annuus*): el rol de las cubiertas del fruto. Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires, Área Producción Vegetal.
- Pizzorno L, Mantese A, Batlla D, López Pereira M. 2014.** Maternal environment effects on sunflower (*Helianthus annuus*) achene dormancy level: photoperiod and incident radiation. Resúmen. 11th Conference of the International Society for Seed Science (ISSS). 15 al 19 de septiembre de 2014 - Changsha, China.
- Ploschuk EL, Hall AJ. 1995.** Capitulum position in sunflower affects grain temperature and duration of grain filling. *Field Crops Research*, 44, 111–117.
- Postma FM, Ågren J. 2015.** Maternal environment affects the genetic basis of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology*, 24(4), 785-97.
- Pourrat Y, Jacques R. 1975.** The influence of photoperiodic conditions received by the mother plant on morphological and physiological characteristics of *Chenopodium polyspermum* L. seeds. *Plant Science Letters*, 4, 273–279.
- 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.
- Quarrie SA, Whitford PN, Appleford NEJ, Wang TL, Cook SK, Henson I, Loveys B. 1988.** A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta*, 173, 330–339.
- R Core Team. 2013.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Raz V, Bergervoet JHW, Koornneef M. 2001.** Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*, 128(2), 243–252.
- Roach DA, Wulff RD. 1987.** Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 209-35.
- Rodríguez MV, Bodrone P, Castellari MP, Batlla D. 2018.** Effect of storage temperature on dormancy release of sunflower (*Helianthus annuus*) achenes. *Seed Science Research*. 1-11.
- Rodríguez MV, Barrero J, Corbineau F, Gubler F, Benech-Arnold RL. 2015.** Dormancy in Cereals (not too much, not so little): About the mechanisms behind this trait. *Seed Science Research*, 25(2), 99-119.
- Rodríguez MV, Toorop PE, Benech-Arnold RL. 2011.** Challenges facing seed banks and agriculture in relation to seed quality. En: Kermodé, A.R., ed., *Seed dormancy: Methods in molecular biology*. Humana Press, New York, USA. p. 17–40.
- Rodríguez MV, Rondanini D, Libenson S, Sánchez RA. 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 MV, Margineda M, González-Martín JF, Insáusti P, Benech-Arnold RL. 2001.** Predicting pre-harvest sprouting susceptibility in barley: A model based on temperature during grain filling. *Agronomy Jour*, 93, 1071-1079.

**Rolletschek H, Borisjuk L, Sánchez-García A, Gotor C, Romero L, Martínez-Rivas J, Mancha M. 2007.** Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Journal of experimental botany*, 58, 3171-81.

**Romagosa I, Prada D, Moralejo M, Sopena A, Muñoz-Odina P, Casas A, Swanston J, Molina-Cano J. 2001.** Dormancy, ABA content and sensitivity of a barley mutant to ABA application during seed development and after ripening. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), 1499-1506.

**Rondanini DP, Mantese A, Savin R, Hall AJ. 2009.** Water content dynamics of achene, pericarp and embryo in sunflower: associations with potential achene size and its dry-down. *European Journal of Agronomy*, 30, 53-62.

**Rondanini D, Savin R, Hall AJ. 2003.** Dynamics of fruit growth and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to brief intervals of high temperature during grain filling. *Field Crops Res.* (83), 79–90.

**Roselló PL, Vigliocco AE, Andrade AM, Riera NV, Calafat M, Molas ML, Alemano SG. 2016.** Differential hormonal and gene expression dynamics in two inbred sunflower lines with contrasting dormancy level. *Plant Physiol. Biochem.* 102, 133–140.

**Ruiz R, Maddonni G. 2006.** Sunflower Seed Weight and Oil Concentration under Different Post-Flowering Source-Sink Ratios. *Crop Science*, 46, 2.

**Sánchez RA, Eyherabide G, de Miguel L. 1981.** The influence of irradiance and water deficit during fruit development on seed dormancy in *Datura ferox* L. *Weed Research*, 21, 127-132.

**Saranga Y, Levi A, Horcicka P, Wolf S. 1998.** Large sunflower seeds are characterized by low embryo vigor. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 123(3), 470-474.

**Satorre EH, Kruk BC, de la Fuente E. 2016.** Bases y herramientas para el manejo de malezas. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires. 285pp.

**Satorre EH, Benech-Arnold RL, Slafer GA, de la Fuente EB, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R. 2003.** Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, pp 717-738.

**Schneiter A, Miller J. 1981.** Description of Sunflower Growth Stages. *Crop Science*, 21, 901-903.

**Schramm EC, Nelson SK, Kidwell KK, Steber CM. 2013.** Increased ABA sensitivity results in higher seed dormancy in soft white spring wheat cultivar 'Zak'. *Theoretical and Applied Genetics*, 126, 791–803.

**Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S. 2009.** Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology*, 69, 347-502.

**Sidhu SS, Cavers PB. 1977.** Maturity-Dormancy Relationships in Attached and Detached Seeds of *Medicago lupulina* L. (Black Medick) *Botanical Gazette*, 138(2), 174-182.

**Smith J, Mengistu A, Randall N, Paris R. 2008.** Identification of Soybean Accessions with High Germinability in High-Temperature Environments. *Crop Science*, 48.

**Steadman KJ, Ellery AJ, Chapman R, Moore A, Turner NC. 2004.** Maturation temperature and rainfall influence seed dormancy characteristics of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Australian Journal of Agricultural Research*, 55, 1047–1057.

**Steinbach HS, Benech-Arnold RL, Sánchez RA. 1997.** Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. *Plant Physiology*, 113, 149-154.

**Steinbach HS, Benech-Arnold RL, Kristof G, Sanchez RA, 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. *Journal of Experimental Botany*, 46, 701-709.

**Subrahmanyam SVR, Kumar SSR, Ranganatha ARG. 2002.** Genotypic differences for seed dormancy in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Seed Research (New Delhi)*, 30, 325–327.

- Sultan SE. 1996.** Phenotypic Plasticity for Offspring Traits in *Polygonum persicaria*. *Ecology*, 77(6), 1791-1807.
- Sung Y, Cantliffe DJ, Nagata R, Nascimento W. 2008.** Structural Changes in Lettuce Seed During Germination at High Temperature Altered by Genotype, Seed Maturation Temperature, and Seed Priming. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 133, 10.
- Sung Y, Cantliffe DJ, Nagata RT. 1998.** Seed developmental temperature regulation of thermotolerance in lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 123, 700-705.
- Tesnier, K., H.M. Strookman-Donkers, J.G. van Pijlen, A.H.M. van der Geest, R.J. Bino, and S.P.C. Groot. 2002.** A controlled deterioration test for *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. *Seed Science and Technology* 30: 149- 165.
- Vaissie P, Monge A, Husson F. 2018.** Factoshiny: Perform Factorial Analysis from 'FactoMineR' with a Shiny Application. R package version 1.0.7.
- Vegis A. 1964.** Dormancy in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 15, 185–224.
- Vigliocco AE, Andrade AM, Lindström LI, Alemano SG. 2017.** Dormancy in sunflower line A-3: The role of the pericarp. *Botany*, 95, 853–858.
- Vigliocco A, Alemano S, Miersch O, Alvarez D, Abdala G. 2007.** Endogenous jasmonates in dry and imbibed sunflower seeds from plants grown at different soil moisture contents. *Seed Science Research*, 17(02), 91-98.
- Villalobos FJ, Sadras VO, Soriano A, Fereres E. 1994.** Planting density effects on dry matter partitioning and productivity of sunflower hybrids. *Field Crops Research*, 36(1), 1-11.
- Vujaković M, Radić V, Miklić V, Jovičić D, Balešević-Tubić S, Mrda J, Škorić D. 2012.** Seed dormancy of hybrids and parent lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 35(56), 111–118.
- Walker-Simmons M, Sessing J. 1990.** Temperature effects on embryonic abscisic acid levels during development of wheat grain dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9, 51-56.
- Walker-Simmons M. 1988.** Enhancement of ABA responsiveness in wheat embryos by high temperature. *Plant, Cell and Environment*, 11, 769–775.
- Walker-Simmons M. 1987.** ABA Levels and Sensitivity in Developing Wheat Embryos of Sprouting Resistant and Susceptible Cultivars. *Plant Physiology*, 84, 61-66.
- Walters C, Wheeler LM, Grotenhuis JM. 2005.** Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research*, 15, 1–20.
- Wang M, Li W, Fang C, Xu F, Liu Y, Wang Z, Yang R, Zhang M, Liu S, Lu S, Lin T, Tang J, Wang YQ, Wang H, Lin H, Zhu B, Chen M, Kong F, Liu B, Tian Z. 2018.** Parallel selection on a dormancy gene during domestication of crops from multiple families. *Nature Genetics*, 50, 1435-1441.
- Wang M, Heimovaara-Dijkstra S, Van Duijn B. 1995.** Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid levels. *Planta*, 195, 586-592.
- Ward JH. 1963.** Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236–244.
- Washitani I. 1987.** A convenient screening test system and a model for thermal germination responses of wild plant seeds: Behaviour of model and real seed in the system. *Plant, Cell and Environment*, 10, 587–598.
- Weidner S, Amarowicz R, Karamać M, Dabrowski G. 1999.** Phenolic acids in caryopses of two cultivars of wheat, rye and triticale that display different resistance to pre-harvest sprouting. *European Food Research and Technology*, 210, 109-113.
- Weidner S, Paprocka J, Lukaszewicz D. 1996.** Changes in free, esterified and glycosidic phenolic acids in cereal grains during the after-ripening. *Seed Science and Technology*, 24, 107-114
- White C, Proebsting W, Hedden P, Rivin C. 2000.** Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin /abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiology*, 122, 1081-1088.
- Wilcox CD, Done SB, McDavid WB, Greer DB. 2002.** Image tool for Windows ver. 3.0. The University of Texas, Health Science Center, Department of Dental Diagnostic Science, San Antonio, Texas, U.S.A.

**Xia Q, Ponnaiah M, Thanikathansubramanian K, Corbineau F, Bailly C, Nambara E, Meimoun P, 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*, 19, 9(1):4861.

**Xu N, Bewley JD. 1991.** Sensitivity to abscisic acid and osmoticum changes during embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Experimental Botany*, 42, 821-826.

**Xu N, Coulter KM, Bewley JD. 1990.** Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfalfa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. *Planta*. 182:382-390.



**Figuras, cuadros y notas suplementarios al capítulo 2.**

**Cuadro S2.1.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas en el período Siembra–Antesis según FS (Temprana o Tardía), genotipo y año evaluado, y la duración en días, de la etapa Siembra–Antesis, para el experimento I. Los valores resaltados en negrita representan las medias ( $\pm$ DE) de las variables ambientales para todos los genotipos en cada FS. Letras distintas indican diferencias significativas entre FS ( $p$ -valor $<$ 0.05). **Abreviaturas:** TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en  $^{\circ}$ C; Fp (h): Fotoperíodo medio, en horas; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en  $\text{MJ m}^{-2}$ ; Duración etapa S–A (d): Duración etapa Siembra–Antesis, en días.

<b>Año–FS– Genotipo</b>	<b>TMd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>TMMxd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>TMMnd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Fp (h)</b>	<b>RIMd (<math>\text{MJ m}^{-2}</math>)</b>	<b>Duración S–A (d)</b>
1–Temprana–AAL	18.4 ( $\pm$ 4.9)	23.0 ( $\pm$ 5.4)	13.9 ( $\pm$ 5.1)	14.3 ( $\pm$ 1.0)	19.8 ( $\pm$ 8.0)	105.9 ( $\pm$ 7.8)
1–Tardía–AAL	25.5 ( $\pm$ 2.0)	30.7 ( $\pm$ 2.3)	20.9 ( $\pm$ 2.3)	15.0 ( $\pm$ 0.4)	23.4 ( $\pm$ 6.1)	56.8 ( $\pm$ 2.5)
1–Temprana–BAR	18.1 ( $\pm$ 4.8)	22.7 ( $\pm$ 5.3)	13.5 ( $\pm$ 4.9)	14.2 ( $\pm$ 1.0)	19.9 ( $\pm$ 8.0)	98.2 ( $\pm$ 9.9)
1–Tardía–BAR	25.5 ( $\pm$ 2.0)	30.7 ( $\pm$ 2.3)	20.8 ( $\pm$ 2.3)	14.9 ( $\pm$ 0.4)	23.1 ( $\pm$ 6.3)	56.5 ( $\pm$ 1.5)
1–Temprana–LMA	19.4 ( $\pm$ 4.7)	23.9 ( $\pm$ 5.2)	14.8 ( $\pm$ 4.7)	14.6 ( $\pm$ 0.8)	20.6 ( $\pm$ 8.1)	114.7 ( $\pm$ 7.6)
1–Tardía–LMA	25.5 ( $\pm$ 2.0)	30.7 ( $\pm$ 2.3)	20.8 ( $\pm$ 2.3)	14.9 ( $\pm$ 0.4)	23.1 ( $\pm$ 6.3)	58.5 ( $\pm$ 1.7)
1–Temprana–1552	17.1 ( $\pm$ 3.5)	21.6 ( $\pm$ 4.2)	12.7 ( $\pm$ 3.8)	14.2 ( $\pm$ 0.7)	19.0 ( $\pm$ 8.1)	78.8 ( $\pm$ 4.0)
1–Tardía–1552	24.6 ( $\pm$ 2.4)	29.7 ( $\pm$ 2.7)	19.8 ( $\pm$ 2.8)	15.3 ( $\pm$ 0.2)	24.2 ( $\pm$ 6.5)	58.5 ( $\pm$ 3.0)
1–Temprana–1579	18.2 ( $\pm$ 4.2)	22.8 ( $\pm$ 4.8)	13.7 ( $\pm$ 4.1)	14.4 ( $\pm$ 0.8)	20.0 ( $\pm$ 8.3)	94.4 ( $\pm$ 1.8)
1–Tardía–1579	24.5 ( $\pm$ 2.4)	29.7 ( $\pm$ 2.7)	19.8 ( $\pm$ 2.7)	15.2 ( $\pm$ 0.2)	24.3 ( $\pm$ 6.3)	64.0 ( $\pm$ 1.5)
1–Temprana–609	17.7 ( $\pm$ 4.0)	22.2 ( $\pm$ 4.8)	13.1 ( $\pm$ 4.0)	14.3 ( $\pm$ 0.8)	19.6 ( $\pm$ 8.2)	84.1 ( $\pm$ 2.2)
1–Tardía–609	24.6 ( $\pm$ 2.4)	29.8 ( $\pm$ 2.7)	19.9 ( $\pm$ 2.7)	15.2 ( $\pm$ 0.3)	24.0 ( $\pm$ 6.4)	68.6 ( $\pm$ 1.8)
1–Temprana–EC	18.6 ( $\pm$ 4.4)	23.2 ( $\pm$ 5.1)	14.1 ( $\pm$ 4.4)	14.5 ( $\pm$ 0.8)	20.5 ( $\pm$ 8.4)	101.6 ( $\pm$ 4.5)
1–Tardía–EC	24.6 ( $\pm$ 2.4)	29.8 ( $\pm$ 2.6)	20.0 ( $\pm$ 2.8)	15.2 ( $\pm$ 0.3)	23.9 ( $\pm$ 6.4)	67.6 ( $\pm$ 2.9)
1–Temprana–HA89	18.2 ( $\pm$ 4.1)	22.7 ( $\pm$ 4.8)	13.6 ( $\pm$ 4.1)	14.4 ( $\pm$ 0.8)	20.1 ( $\pm$ 8.3)	93.9 ( $\pm$ 2.7)
1–Tardía–HA89	24.5 ( $\pm$ 2.4)	29.6 ( $\pm$ 2.7)	19.7 ( $\pm$ 2.8)	15.3 ( $\pm$ 0.2)	24.3 ( $\pm$ 6.4)	61.7 ( $\pm$ 0.5)
<b>1–Temprana</b>	<b>18.2 (<math>\pm</math>0.6)<sup>b</sup></b>	<b>22.8 (<math>\pm</math>0.6)<sup>b</sup></b>	<b>13.7 (<math>\pm</math>0.6)<sup>b</sup></b>	<b>14.4 (<math>\pm</math>0.1)<sup>b</sup></b>	<b>19.9 (<math>\pm</math>0.5)<sup>b</sup></b>	<b>96.5 (<math>\pm</math>11.9)<sup>b</sup></b>
<b>1–Tardía</b>	<b>24.1 (<math>\pm</math>2.5)<sup>a</sup></b>	<b>29.2 (<math>\pm</math>2.6)<sup>a</sup></b>	<b>19.5 (<math>\pm</math>2.4)<sup>a</sup></b>	<b>15.0 (<math>\pm</math>0.2)<sup>a</sup></b>	<b>23.3 (<math>\pm</math>1.3)<sup>a</sup></b>	<b>65.6 (<math>\pm</math>12.1)<sup>a</sup></b>
2–Temprana–581	17.8 ( $\pm$ 4.3)	22.8 ( $\pm$ 5.5)	12.8 ( $\pm$ 4.1)	14.0 ( $\pm$ 0.9)	18.5 ( $\pm$ 7.9)	97.7 ( $\pm$ 4.7)
2–Tardía–581	24.6 ( $\pm$ 2.8)	29.7 ( $\pm$ 3.3)	19.7 ( $\pm$ 3.1)	14.5 ( $\pm$ 0.6)	20.2 ( $\pm$ 6.5)	63.0 ( $\pm$ 2.9)
2–Temprana–591	17.5 ( $\pm$ 4.3)	22.4 ( $\pm$ 5.4)	12.7 ( $\pm$ 4.1)	13.9 ( $\pm$ 0.9)	17.9 ( $\pm$ 7.7)	92.8 ( $\pm$ 0.5)
2–Tardía–591	24.8 ( $\pm$ 2.8)	29.9 ( $\pm$ 3.3)	19.9 ( $\pm$ 3.0)	14.6 ( $\pm$ 0.5)	20.4 ( $\pm$ 6.6)	59.3 ( $\pm$ 1.5)
2–Temprana–600	17.6 ( $\pm$ 4.3)	22.5 ( $\pm$ 5.4)	12.7 ( $\pm$ 4.1)	13.9 ( $\pm$ 0.9)	18.1 ( $\pm$ 7.8)	92.9 ( $\pm$ 5.9)
2–Tardía–600	24.6 ( $\pm$ 2.8)	29.7 ( $\pm$ 3.3)	19.7 ( $\pm$ 3.1)	14.5 ( $\pm$ 0.6)	20.2 ( $\pm$ 6.5)	63.3 ( $\pm$ 1.2)
2–Temprana–601	17.3 ( $\pm$ 4.1)	22.1 ( $\pm$ 5.2)	12.4 ( $\pm$ 4.0)	13.9 ( $\pm$ 0.9)	17.7 ( $\pm$ 7.7)	89.9 ( $\pm$ 6.0)
2–Tardía–601	24.5 ( $\pm$ 2.8)	29.7 ( $\pm$ 3.3)	19.6 ( $\pm$ 3.2)	14.5 ( $\pm$ 0.6)	20.2 ( $\pm$ 6.5)	65.5 ( $\pm$ 0.6)
2–Temprana–608	17.4 ( $\pm$ 4.2)	22.3 ( $\pm$ 5.3)	12.6 ( $\pm$ 4.1)	13.9 ( $\pm$ 0.9)	17.9 ( $\pm$ 7.7)	88.1 ( $\pm$ 1.7)
2–Tardía–608	24.5 ( $\pm$ 2.8)	29.7 ( $\pm$ 3.3)	19.6 ( $\pm$ 3.2)	14.5 ( $\pm$ 0.6)	20.2 ( $\pm$ 6.5)	65.7 ( $\pm$ 1.3)

2–Temprana–609	17.1 (±4.0)	21.9 (±5.1)	12.3 (±3.9)	13.9 (±0.9)	17.5 (±7.7)	90.5 (±5.3)
2–Tardía–609	24.6 (±2.8)	29.7 (±3.2)	19.7 (±3.1)	14.5 (±0.6)	20.1 (±6.5)	64.6 (±1.2)
2–Temprana–1552	16.6 (±3.8)	21.2 (±4.9)	11.9 (±3.7)	13.7 (±0.8)	16.8 (±7.5)	102.3 (±3.2)
2–Tardía–1552	24.7 (±2.8)	29.8 (±3.3)	19.7 (±3.1)	14.6 (±0.5)	20.4 (±6.6)	58.7 (±1.8)
2–Temprana–1575	17.8 (±4.4)	22.8 (±5.5)	12.9 (±4.1)	14.0 (±0.9)	18.6 (±7.9)	92.0 (±4.0)
2–Tardía–1575	24.6 (±2.8)	29.7 (±3.3)	19.7 (±3.1)	14.5 (±0.6)	20.2 (±6.5)	61.1 (±1.9)
2–Temprana–1579	17.7 (±4.3)	22.6 (±5.4)	12.8 (±4.1)	14.0 (±0.9)	18.2 (±7.8)	109.2 (±4.7)
2–Tardía–1579	24.6 (±2.8)	29.7 (±3.2)	19.7 (±3.1)	14.5 (±0.6)	20.1 (±6.5)	63.7 (±1.4)
2–Temprana–1673	17.9 (±4.4)	22.9 (±5.6)	13.0 (±4.2)	14.0 (±0.9)	18.6 (±7.8)	97.7 (±5.5)
2–Tardía–1673	24.7 (±2.8)	29.8 (±3.3)	19.7 (±3.1)	14.6 (±0.5)	20.4 (±6.6)	60.2 (±1.6)
2–Temprana–1679	17.7 (±4.3)	22.6 (±5.4)	12.8 (±4.1)	14.0 (±0.9)	18.2 (±7.8)	91.8 (±1.8)
2–Tardía–1679	24.6 (±2.8)	29.7 (±3.2)	19.7 (±3.1)	14.5 (±0.6)	20.1 (±6.5)	64.8 (±1.7)
2–Temprana–GB	18.3 (±4.5)	23.4 (±5.7)	13.2 (±4.2)	14.1 (±1.0)	19.1 (±8.0)	108.8 (±4.1)
2–Tardía–GB	24.7 (±2.8)	29.8 (±3.3)	19.7 (±3.1)	14.5 (±0.5)	20.4 (±6.5)	61.9 (±1.3)
2–Temprana–HA342	17.6 (±4.3)	22.5 (±5.4)	12.7 (±4.1)	13.9 (±0.9)	18.1 (±7.8)	96.5 (±2.3)
2–Tardía–HA342	24.8 (±2.8)	29.9 (±3.3)	19.9 (±3.0)	14.6 (±0.5)	20.4 (±6.6)	59.7 (±1.3)
2–Temprana–HA89	17.9 (±4.4)	22.9 (±5.6)	13.0 (±4.2)	14.0 (±0.9)	18.6 (±7.8)	100.8 (±3.6)
2–Tardía–HA89	24.6 (±2.8)	29.7 (±3.3)	19.7 (±3.1)	14.5 (±0.6)	20.2 (±6.5)	63.6 (±1.4)
<b>2–Temprana</b>	<b>17.6 (±0.4)<sup>b</sup></b>	<b>22.5 (±0.5)<sup>b</sup></b>	<b>12.7 (±0.3)<sup>b</sup></b>	<b>14.0 (±0.1)<sup>b</sup></b>	<b>18.1 (±0.5)<sup>b</sup></b>	<b>96.5 (±6.7)<sup>b</sup></b>
<b>2–Tardía</b>	<b>24.7 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>29.8 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>19.7 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>14.5 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>20.3 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>62.5 (±2.3)<sup>a</sup></b>
3–Temprana–1552	19.9 (±3.4)	25.4 (±4.4)	14.3 (±3.5)	14.7 (±0.5)	22.6 (±7.0)	70.2 (±2.1)
3–Tardía–1552	24.9 (±2.9)	30.4 (±3.5)	19.7 (±3.1)	14.7 (±0.5)	25.4 (±6.1)	53.7 (±1.5)
3–Temprana–1579	20.7 (±3.9)	26.2 (±4.8)	15.1 (±3.9)	14.8 (±0.5)	22.9 (±7.3)	85.5 (±1.7)
3–Tardía–1579	24.9 (±2.9)	30.4 (±3.4)	19.7 (±3.1)	14.6 (±0.5)	25.2 (±5.9)	57.0 (±1.5)
3–Temprana–B123	20.4 (±3.7)	25.9 (±4.6)	14.9 (±3.8)	14.8 (±0.5)	22.8 (±7.2)	78.9 (±1.1)
3–Tardía–B123	24.9 (±3.0)	30.4 (±3.5)	19.7 (±3.2)	14.7 (±0.4)	25.4 (±6.1)	54.1 (±2.0)
3–Temprana–B91	20.1 (±3.5)	25.5 (±4.4)	14.6 (±3.6)	14.8 (±0.5)	22.6 (±7.3)	75.2 (±1.2)
3–Tardía–B91	24.9 (±2.9)	30.4 (±3.5)	19.7 (±3.1)	14.7 (±0.5)	25.4 (±6.1)	54.0 (±1.7)
<b>3–Temprana</b>	<b>20.3 (±0.3)<sup>b</sup></b>	<b>25.8 (±0.3)<sup>b</sup></b>	<b>14.7 (±0.3)<sup>b</sup></b>	<b>14.8 (±0.1)<sup>b</sup></b>	<b>22.7 (±0.1)<sup>b</sup></b>	<b>77.4 (±6.4)<sup>b</sup></b>
<b>3–Tardía</b>	<b>24.9 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>30.4 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>19.7 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>14.7 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>25.3 (±0.1)<sup>a</sup></b>	<b>54.7 (±1.5)<sup>a</sup></b>

**Cuadro S2.2.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas en diferentes estadios ontogénicos (Schneider y Miller, 1981) para el genotipo 1579 en la campaña 16/17 (experimento II), según la FS. Letras distintas indican diferencias significativas entre FS ( $p$ -valor $<0.05$ ). "nd" significa que no hay datos. Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en  $^{\circ}$ C; Fp (h): Fotoperíodo medio, en horas; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en  $\text{MJ m}^{-2}$ .

FS	TMd ( $^{\circ}$ C)	TMMxd ( $^{\circ}$ C)	TMMnd ( $^{\circ}$ C)	Fp (h)	RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ )
<b>Siembra– Primera Antesis (R5.1)</b>					
1 de septiembre	17.5 ( $\pm 4.4$ ) <sup>d</sup>	22.4 ( $\pm 5.5$ ) <sup>c</sup>	12.7 ( $\pm 4.1$ ) <sup>d</sup>	13.9 ( $\pm 0.9$ ) <sup>c</sup>	18.1 ( $\pm 7.8$ ) <sup>b</sup>
3 de octubre	19.9 ( $\pm 4.0$ ) <sup>c</sup>	25.1 ( $\pm 5.2$ ) <sup>b</sup>	14.6 ( $\pm 3.8$ ) <sup>c</sup>	14.6 ( $\pm 0.7$ ) <sup>b</sup>	20.3 ( $\pm 8.2$ ) <sup>ab</sup>
1 de noviembre	22.8 ( $\pm 3.4$ ) <sup>b</sup>	28.4 ( $\pm 4.0$ ) <sup>a</sup>	17.2 ( $\pm 4.1$ ) <sup>b</sup>	15.2 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	22.8 ( $\pm 7.5$ ) <sup>a</sup>
1 de diciembre	24.4 ( $\pm 2.8$ ) <sup>a</sup>	29.9 ( $\pm 3.0$ ) <sup>a</sup>	19.1 ( $\pm 3.5$ ) <sup>a</sup>	15.2 ( $\pm 0.2$ ) <sup>a</sup>	22.8 ( $\pm 7.1$ ) <sup>a</sup>
4 de enero	24.6 ( $\pm 2.8$ ) <sup>a</sup>	29.7 ( $\pm 3.2$ ) <sup>a</sup>	19.7 ( $\pm 3.1$ ) <sup>a</sup>	14.5 ( $\pm 0.6$ ) <sup>b</sup>	20.1 ( $\pm 6.5$ ) <sup>ab</sup>
<b>Período de Antesis (R5.1–R5.10)</b>					
1 de septiembre	24.1 ( $\pm 2.2$ ) <sup>abc</sup>	30.5 ( $\pm 3.0$ ) <sup>ab</sup>	17.5 ( $\pm 3.1$ ) <sup>ab</sup>	nd	26.9 ( $\pm 2.3$ ) <sup>a</sup>
3 de octubre	25.7 ( $\pm 2.6$ ) <sup>a</sup>	30.8 ( $\pm 2.9$ ) <sup>a</sup>	21.5 ( $\pm 2.8$ ) <sup>a</sup>	nd	20.9 ( $\pm 9.2$ ) <sup>ab</sup>
1 de noviembre	25.1 ( $\pm 2.0$ ) <sup>ab</sup>	29.9 ( $\pm 2.6$ ) <sup>ab</sup>	20.2 ( $\pm 2.6$ ) <sup>ab</sup>	nd	21.2 ( $\pm 8.0$ ) <sup>ab</sup>
1 de diciembre	22.1 ( $\pm 2.4$ ) <sup>bc</sup>	26.8 ( $\pm 3.3$ ) <sup>b</sup>	18.3 ( $\pm 3.2$ ) <sup>ab</sup>	nd	17.4 ( $\pm 8.0$ ) <sup>ab</sup>
4 de enero	21.3 ( $\pm 2.4$ ) <sup>b</sup>	26.6 ( $\pm 2.3$ ) <sup>b</sup>	16.2 ( $\pm 4.2$ ) <sup>b</sup>	nd	16.1 ( $\pm 5.0$ ) <sup>b</sup>
<b>Período de llenado (R6–MF)</b>					
1 de septiembre	23.6 ( $\pm 2.6$ ) <sup>a</sup>	29.6 ( $\pm 3.1$ ) <sup>a</sup>	18.0 ( $\pm 2.9$ ) <sup>ab</sup>	15.4 ( $\pm 0.1$ ) <sup>a</sup>	23.0 ( $\pm 8.9$ ) <sup>a</sup>
3 de octubre	25.4 ( $\pm 2.3$ ) <sup>a</sup>	30.3 ( $\pm 2.3$ ) <sup>a</sup>	20.4 ( $\pm 3.2$ ) <sup>a</sup>	15.4 ( $\pm 0.1$ ) <sup>a</sup>	22.7 ( $\pm 6.5$ ) <sup>a</sup>
1 de noviembre	24.5 ( $\pm 3.3$ ) <sup>a</sup>	29.3 ( $\pm 3.6$ ) <sup>a</sup>	19.7 ( $\pm 3.6$ ) <sup>a</sup>	14.9 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>	21.0 ( $\pm 6.8$ ) <sup>ab</sup>
1 de diciembre	25.0 ( $\pm 2.6$ ) <sup>a</sup>	30.3 ( $\pm 3.3$ ) <sup>a</sup>	20.3 ( $\pm 2.6$ ) <sup>a</sup>	14.1 ( $\pm 0.2$ ) <sup>c</sup>	19.3 ( $\pm 6.0$ ) <sup>ab</sup>
4 de enero	20.6 ( $\pm 2.4$ ) <sup>b</sup>	25.7 ( $\pm 2.4$ ) <sup>b</sup>	15.7 ( $\pm 3.8$ ) <sup>b</sup>	13.0 ( $\pm 0.2$ ) <sup>d</sup>	16.8 ( $\pm 5.0$ ) <sup>b</sup>
<b>Período de secado (MF–MC)</b>					
1 de septiembre	25.4 ( $\pm 2.6$ ) <sup>a</sup>	30.3 ( $\pm 2.8$ ) <sup>a</sup>	20.4 ( $\pm 3.5$ ) <sup>a</sup>	15.2 ( $\pm 0.2$ ) <sup>a</sup>	22.5 ( $\pm 6.5$ ) <sup>a</sup>
3 de octubre	24.3 ( $\pm 3.3$ ) <sup>a</sup>	29.2 ( $\pm 3.5$ ) <sup>ab</sup>	19.2 ( $\pm 3.9$ ) <sup>ab</sup>	14.9 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>	21.4 ( $\pm 6.7$ ) <sup>a</sup>
1 de noviembre	25.1 ( $\pm 2.9$ ) <sup>a</sup>	30.5 ( $\pm 3.4$ ) <sup>a</sup>	20.3 ( $\pm 2.9$ ) <sup>a</sup>	14.1 ( $\pm 0.3$ ) <sup>c</sup>	19.8 ( $\pm 5.7$ ) <sup>a</sup>
1 de diciembre	21.6 ( $\pm 3.6$ ) <sup>b</sup>	26.8 ( $\pm 3.9$ ) <sup>bc</sup>	16.3 ( $\pm 4.5$ ) <sup>b</sup>	13.3 ( $\pm 0.3$ ) <sup>d</sup>	17.5 ( $\pm 5.6$ ) <sup>a</sup>
4 de enero	20.3 ( $\pm 2.6$ ) <sup>b</sup>	25.1 ( $\pm 2.5$ ) <sup>c</sup>	16.4 ( $\pm 3.7$ ) <sup>b</sup>	12.4 ( $\pm 0.2$ ) <sup>e</sup>	12.2 ( $\pm 5.2$ ) <sup>b</sup>

**Cuadro S2.3.** Datos asociados al rendimiento del genotipo 1579 según FS (experimento II). Se presentan los valores medios ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p$ -valor $<0.05$ ) entre FS. La duración del llenado del fruto se expresa en días desde anthesis y la tasa de llenado del fruto se estimó mediante un ajuste bilineal (Fig. S2.3), expresada en  $\text{mg d}^{-1}$ . El peso final del fruto y sus parámetros (duración y tasa de llenado) se midieron en el tercio medio del capítulo.

FS	Duración del llenado (d)	Tasa de llenado ( $\text{mg d}^{-1}$ )	Peso seco final del fruto (mg)	Rendimiento ( $\text{g planta}^{-1}$ )
1 de septiembre	18.5 ( $\pm 3.3$ ) <sup>a</sup>	2.2 ( $\pm 0.1$ ) <sup>a</sup>	41.9 ( $\pm 3.1$ ) <sup>ab</sup>	54.8 ( $\pm 10.0$ ) <sup>a</sup>
3 de octubre	20.2 ( $\pm 1.5$ ) <sup>a</sup>	2.2 ( $\pm 0.2$ ) <sup>a</sup>	44.1 ( $\pm 1.3$ ) <sup>a</sup>	53.8 ( $\pm 05.4$ ) <sup>a</sup>
1 de noviembre	18.7 ( $\pm 5.3$ ) <sup>a</sup>	2.1 ( $\pm 0.6$ ) <sup>a</sup>	37.1 ( $\pm 1.1$ ) <sup>bc</sup>	50.0 ( $\pm 10.5$ ) <sup>ab</sup>
1 de diciembre	19.7 ( $\pm 1.4$ ) <sup>a</sup>	1.8 ( $\pm 0.1$ ) <sup>a</sup>	32.7 ( $\pm 3.1$ ) <sup>c</sup>	38.0 ( $\pm 13.1$ ) <sup>ab</sup>
4 de enero	20.2 ( $\pm 1.7$ ) <sup>a</sup>	1.7 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	36.7 ( $\pm 1.5$ ) <sup>bc</sup>	28.4 ( $\pm 06.5$ ) <sup>b</sup>

**Cuadro S2.4.** Caracterización del secado de los frutos del genotipo 1579 según FS (experimento II). Se presentan valores promedio ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Las tasas de secado se calcularon a través de un modelo lineal y bilineal, para las FS tempranas (1 de septiembre, 3 de octubre y 1 de noviembre) y tardías (1 de diciembre y 4 de enero), respectivamente.

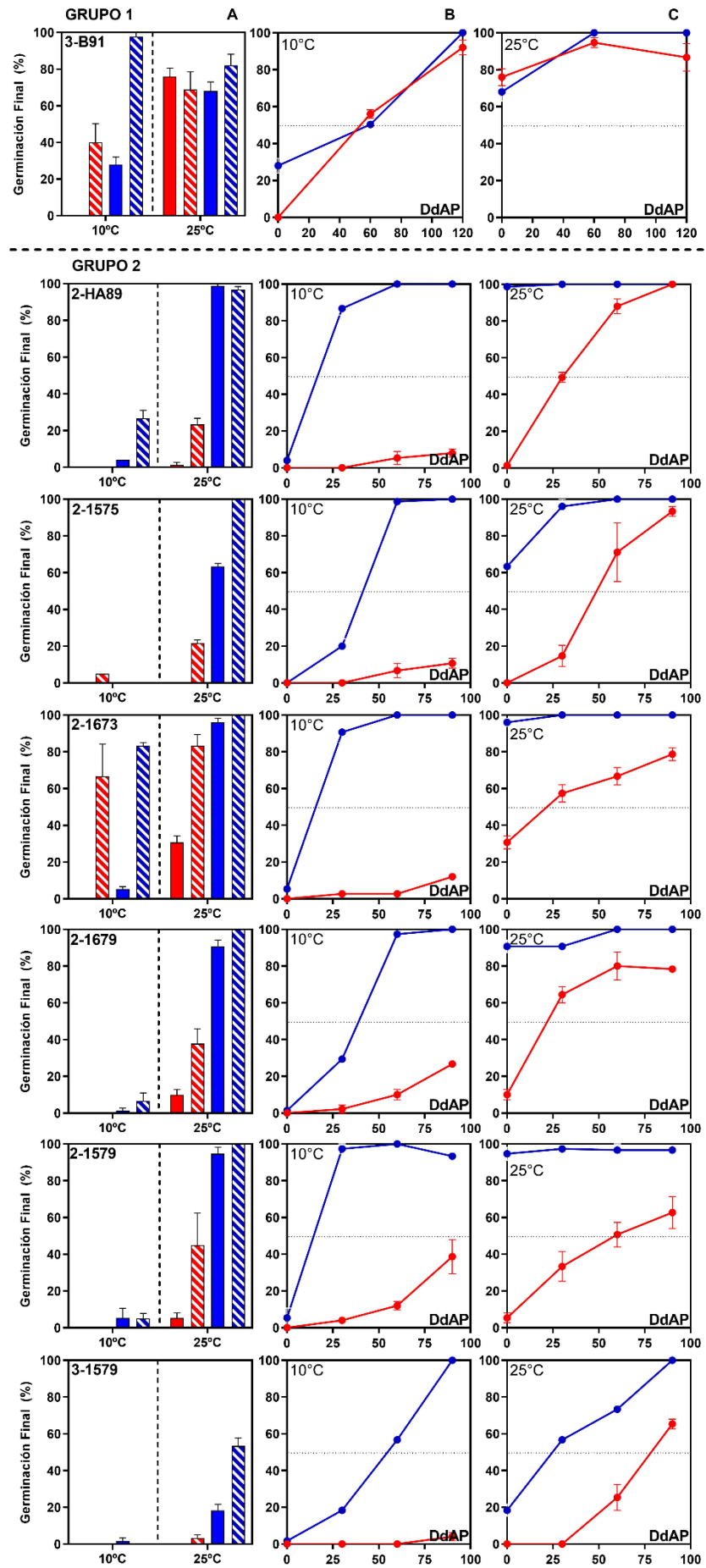
FS	Tasa secado inicial ( $\% \text{ d}^{-1}$ )	Punto de quiebre entre tasas de secado (días desde R5.5)	Tasa secado final ( $\% \text{ d}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>
1 de septiembre	-2.8 ( $\pm 0.2$ )	-	-	0.97
3 de octubre	-2.1 ( $\pm 0.1$ )	-	-	0.99
1 de noviembre	-2.7 ( $\pm 0.2$ )	-	-	0.97
1 de diciembre	-2.1 ( $\pm 0.1$ )	39 ( $\pm 1.5$ )	-0.9 ( $\pm 0.3$ )	0.98
4 de enero	-2.0 ( $\pm 0.1$ )	35 ( $\pm 2.8$ )	-1.0 ( $\pm 0.1$ )	0.98

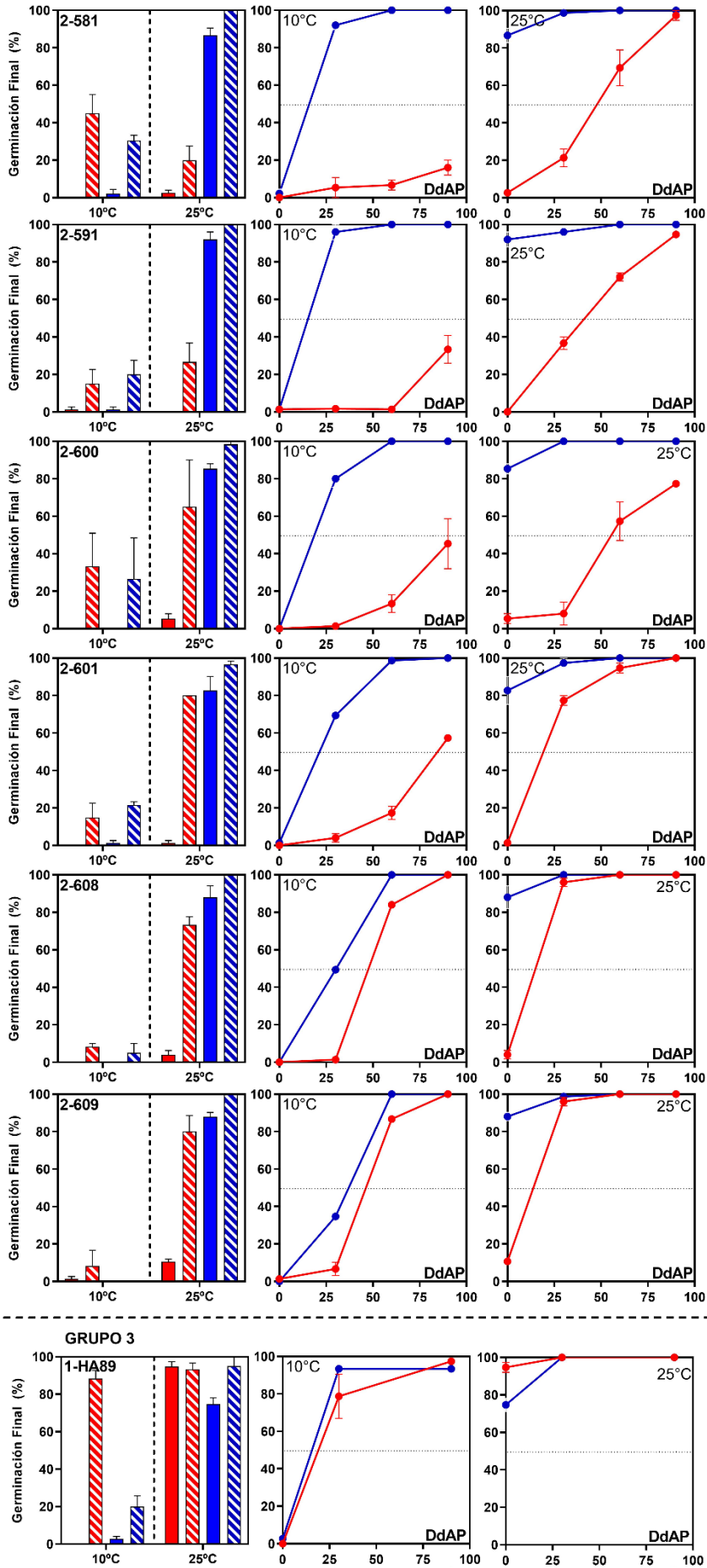
**Cuadro S2.5.** Valores estimados de los parámetros medios poblacionales del rango térmico permisivo para la germinación y DE de los parámetros, según se describe en el material complementario "Desarrollo y validación de modelos". Los datos utilizados para este análisis provienen de la campaña 15/16, ya que se analizaron varias temperaturas de incubación (ver sección 2.2.3. *Ensayos de germinación*).

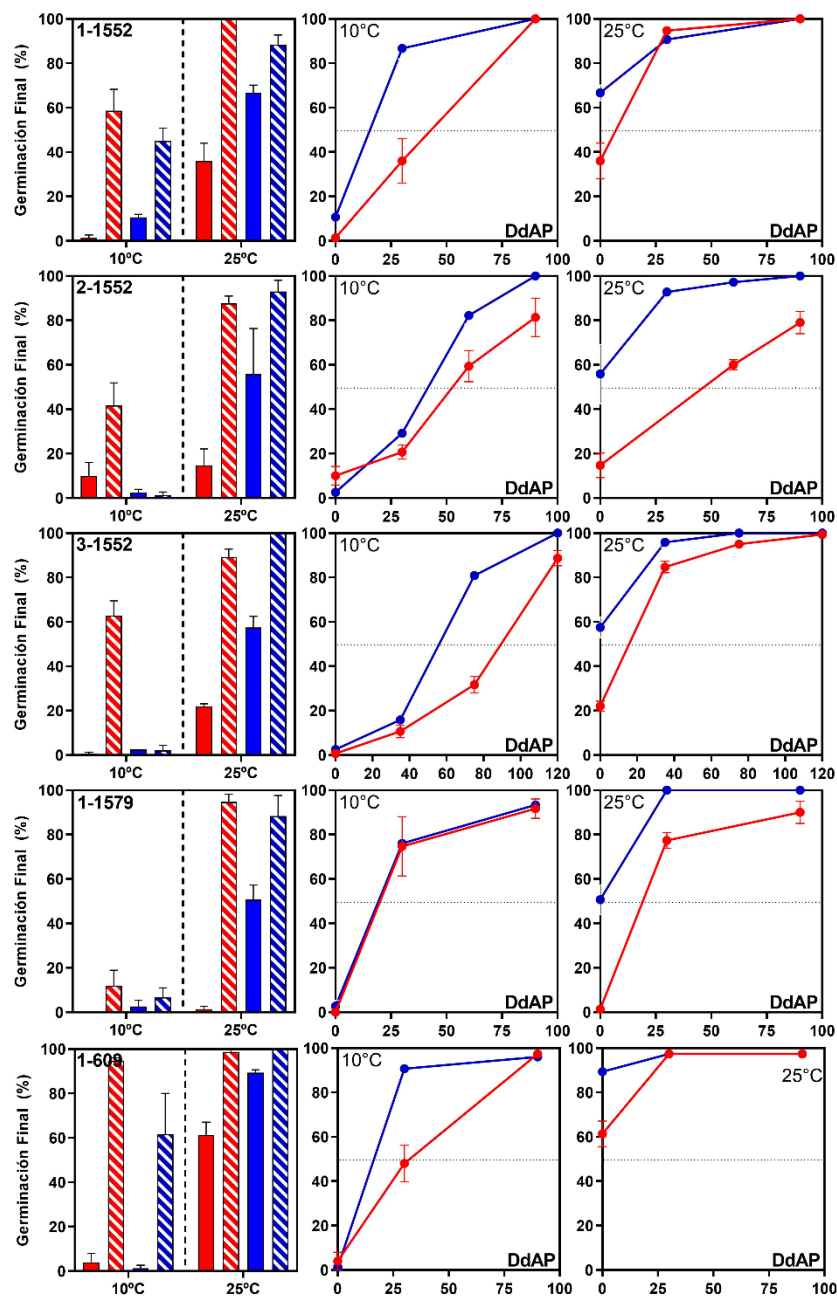
FS-Genotipo	DdAP	T <sub>i(50)</sub> (°C)	$\sigma$ T <sub>i(50)</sub>	T <sub>s(50)</sub> (°C)	$\sigma$ T <sub>s(50)</sub>	$\theta_{T(50)}$ (°C h)	$\sigma$ $\theta_{T(50)}$	R <sup>2</sup>
Temprana-1552	30	11.8	4.7	37.7	4.9	40.6	19.4	0.99
Tardía-1552	30	6.9	2.8	36.5	5.4	17.5	6.7	0.98
Temprana-1579	30	8.0	3.2	29.6	6.2	63.7	31.9	0.99
Tardía-1579	30	7.8	3.1	34.4	6.3	51.8	25.9	0.99
Temprana-AAL	30	12.1	1.8	18.5	5.6	93.1	34.3	0.97
Tardía-AAL	30	8.8	2.6	23.7	9.5	45.9	20.5	0.94

**Cuadro S2.6.** Relación entre la germinación de los frutos a los 60 días de almacenaje post-cosecha, incubados a 10 o 25°C y las cinco variables ambientales registradas desde la MF-MC (Cuadro S2.2, Período de secado (MF-MC)), para el genotipo 1579 en el año 16/17 (experimento II) en todas las FS. Se presentan los coeficientes de correlación de Pearson "r" y los asteriscos indican que la relación es significativa ( $p$ -valor $<0.05$ ,  $n=30$ ).

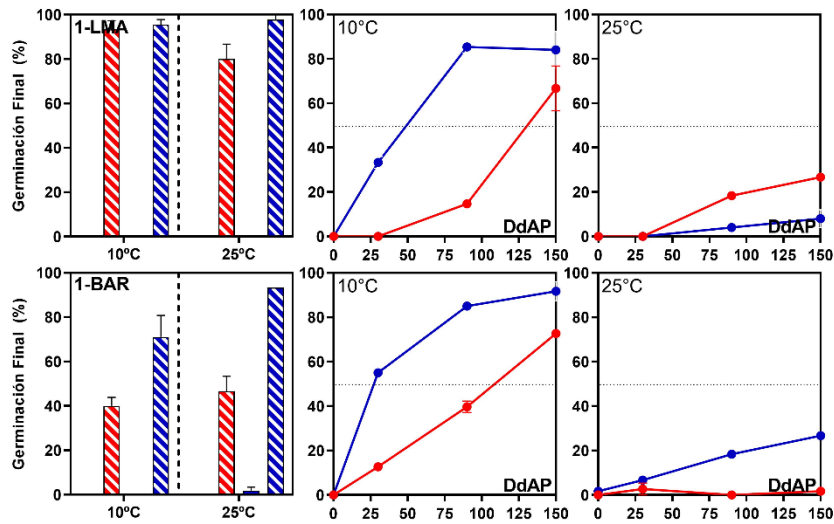
	10°C	25°C
TMd (°C)	-0.96 *	-0.92 *
TMMxd (°C)	-0.97 *	-0.88 *
TMMnd (°C)	-0.90 *	-0.92 *
Fp (h)	-0.88 *	-0.95 *
RIMd (MJ m <sup>-2</sup> )	-0.93 *	-0.89 *

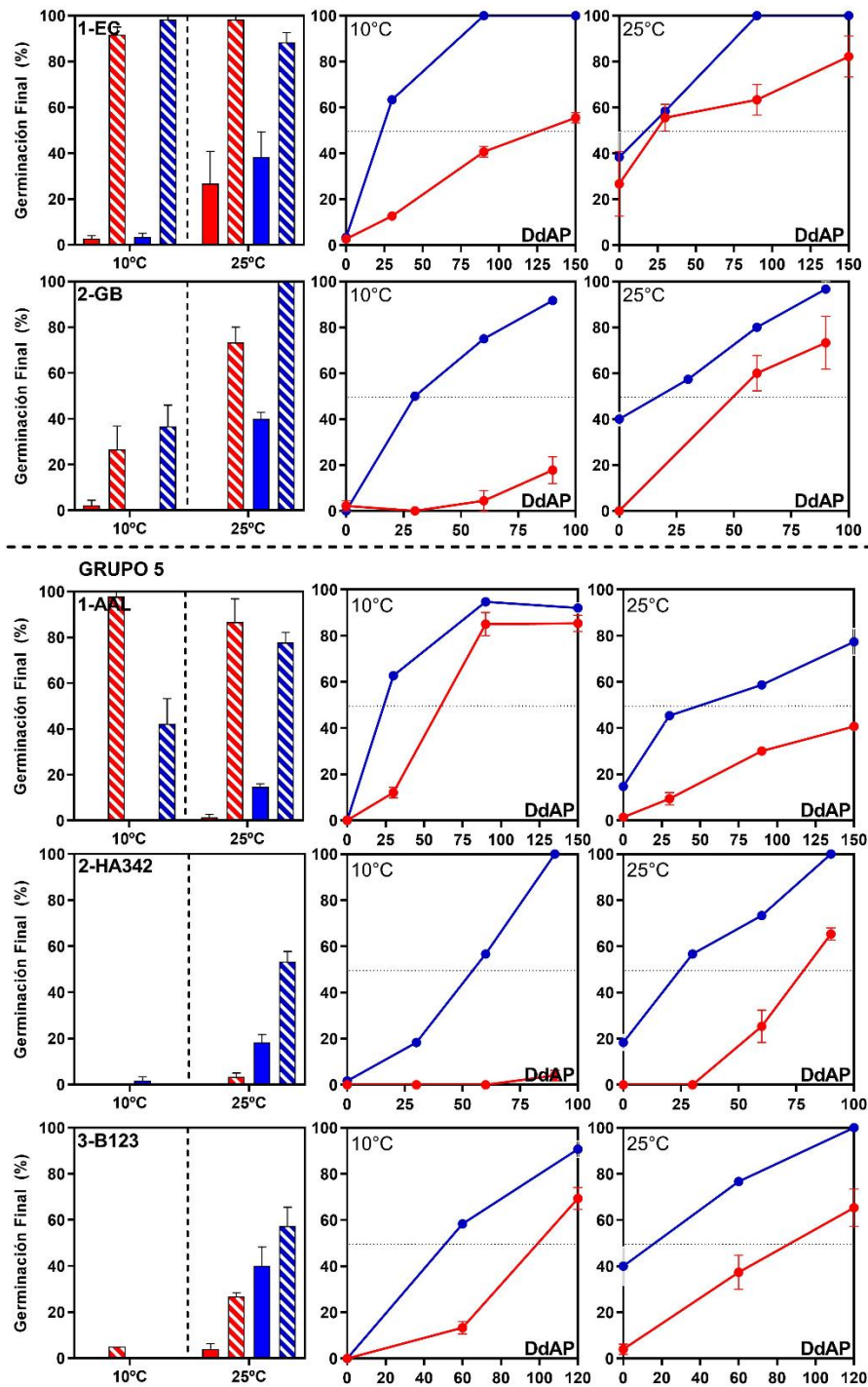






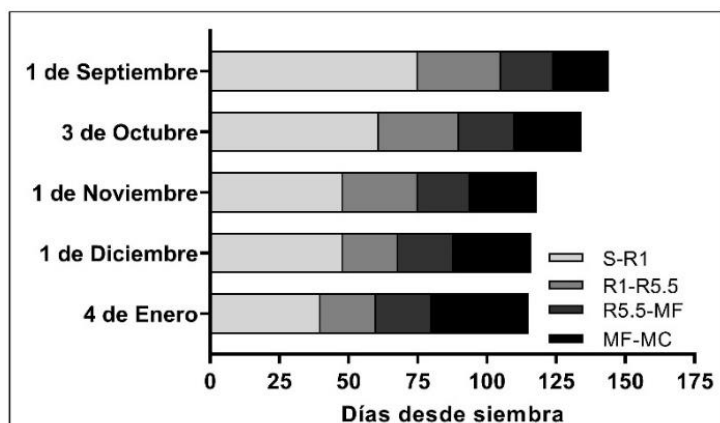
GRUPO 4



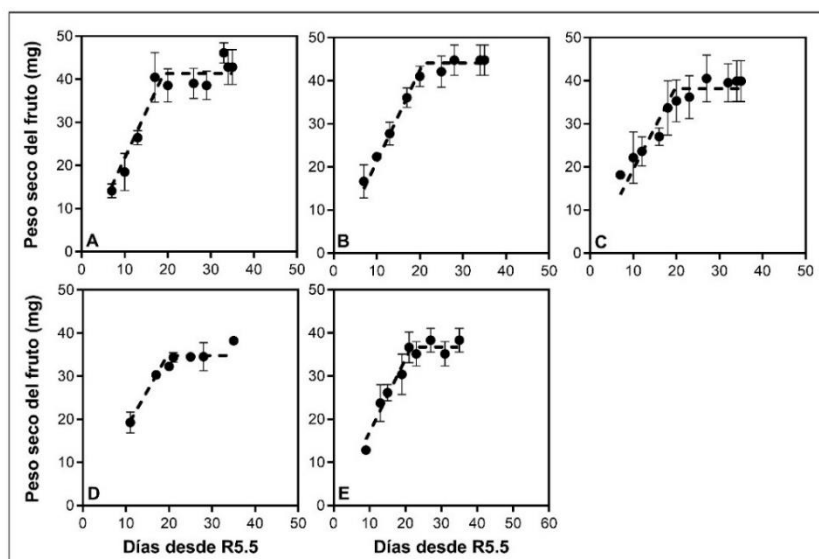


**Fig. S2. 1.** Ejemplos de genotipos agrupados según el análisis de conglomerados (Fig. 2.2). A. Porcentaje final de germinación de frutos (barras llenas) y embriones (barras con líneas diagonales) a cosecha, incubados a 10 y 25°C, provenientes de FS tempranas (barras rojas) y tardías (barras azules). Porcentaje final de germinación de frutos en función de los días de almacenaje post-cosecha (DdAP), provenientes de FS tempranas (líneas rojas) y tardías (líneas azules), incubados a 10°C (B) y a 25°C (C). Las barras (A) y los puntos (B y C) representan los valores medios de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo

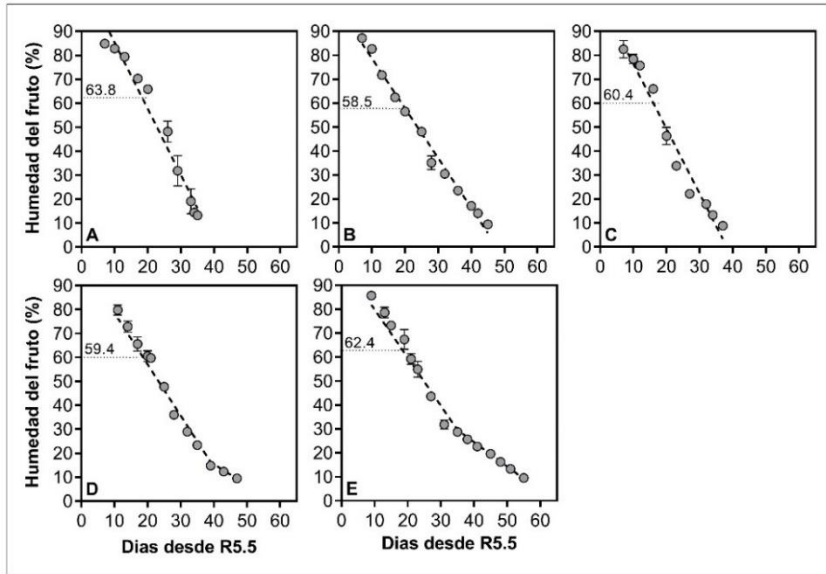




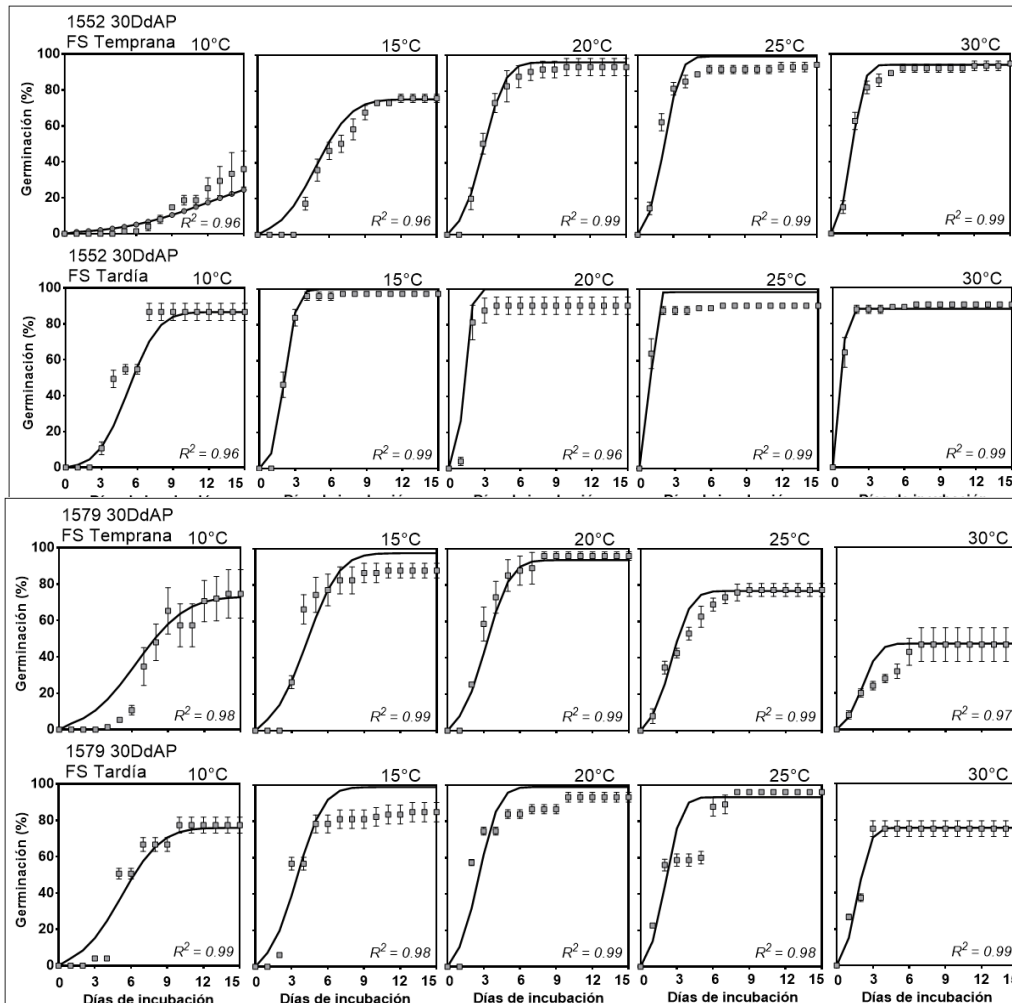
**Fig. S2. 2.** Duración promedio de los estadios ontogénicos para el genotipo 1579 en la campaña 16/17 (experimento II), según FS. Las etapas ontogénicas (Schneiter y Miller, 1981) son: Siembra–Estrella visible (S–R1); Estrella visible–Antesis (R1–R5.5); Antesis–MF (R5.5–MF); Madurez Fisiológica–Madurez de Cosecha (MF–MC).

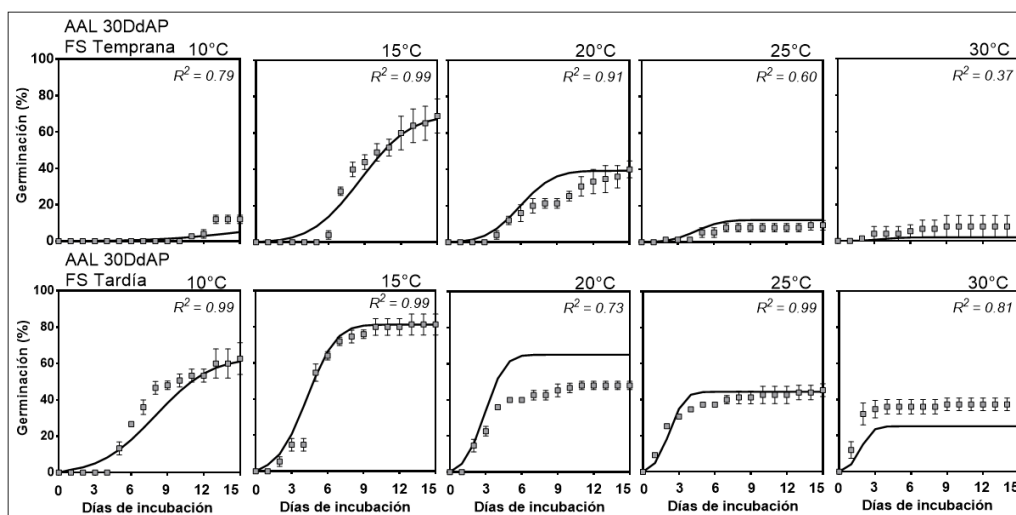


**Fig. S2. 3.** Evolución del peso seco unitario del fruto (mg) y de la humedad del fruto (%) en función de los días desde antesis (R5.5) para el genotipo 1579 en la campaña 16/17 (experimento II), según FS (1 de septiembre (A), 3 de octubre (B), 1 de noviembre (C), 1 de diciembre (D) y 4 de enero (E)). Los puntos representan datos promedio del peso seco y del contenido de humedad ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Para los datos del peso seco del fruto, se hizo un ajuste bilineal. La cosecha se produjo el 16 de enero, el 7 de febrero, el 27 de febrero, el 27 de marzo y el 3 de mayo para las FS de septiembre, octubre, noviembre, diciembre y enero, respectivamente.



**Fig. S2. 4.** Evolución de la humedad del fruto (%) en función de los días desde antesis (R5.5) para el genotipo 1579, según FS (1 de septiembre (A), 3 de octubre (B), 1 de noviembre (C), 1 de diciembre (D) y 4 de enero (E)). Los puntos indican el promedio del porcentaje de humedad ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Se ajustó un modelo lineal a los datos de humedad de las FS tempranas (A, B y C) y un modelo bilineal a las FS tardías (D y E). Las tasas de secado de las FS se encuentran en la Cuadro S2.4. Para cada FS, se resalta el contenido de humedad promedio ( $\pm$ EE,  $n=3$ ) de los frutos al momento de MF.





**Fig. S2. 5.** Datos medios observados ( $\pm$ EE,  $n=3$ ; cuadrados grises) y simulados (líneas negras) de germinación de los frutos a distintas temperaturas de incubación. Las curvas simuladas se calcularon para cada población utilizando los parámetros del Cuadro S2.4. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de los valores observados y simulados se muestra dentro de cada panel. Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### Desarrollo y validación de modelos

Los parámetros que describen la amplitud del rango térmico permisivo para la germinación durante la salida de la dormición primaria se cuantificaron empleando un modelo matemático desarrollado por Batlla y Benech-Arnold (2015). El mismo supone que las semillas pueden germinar entre una temperatura inferior y una superior, ambas con distribución normal dentro de la población de semillas (Washitani, 1987). Estos límites, en promedio, se conocen como *temperatura del límite inferior* " $T_{i(50)}$ " y *temperatura del límite superior* " $T_{s(50)}$ ", y sus respectivas desviaciones estándar,  $\sigma T_{i(50)}$  y  $\sigma T_{s(50)}$ . De acuerdo al modelo, la fracción de semillas que germina a una temperatura de incubación dada se calculó como sigue:

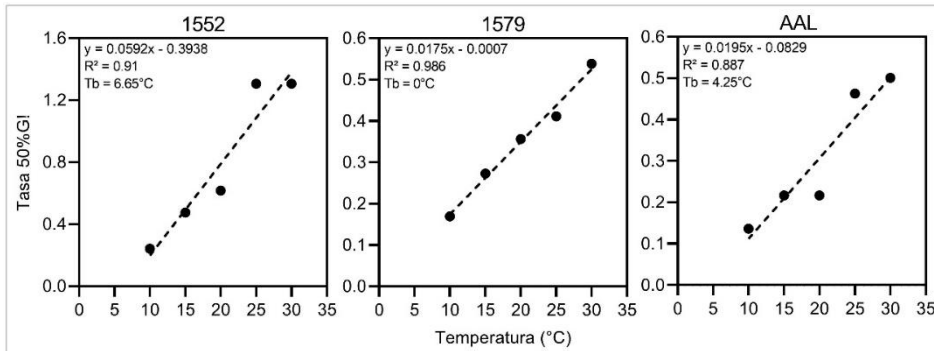
$$p(T) = \Phi [(T - T_{i(50)}) / \sigma T_{i(50)}] - \{1 - \Phi [(T - T_{s(50)}) / \sigma T_{s(50)}]\} \quad (1)$$

donde " $p(T)$ " es la proporción de semillas que germinan a la temperatura " $T$ " y " $\Phi$ " es la función de distribución acumulativa normal estándar. El modelo supone que para la fracción de semillas en la que " $T$ " se encuentra dentro de los límites " $T_i$ " y " $T_s$ ", 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 semillas con una media ( $\theta T_{(50)}$ ) y una desviación estándar ( $\sigma \theta T_{(50)}$ ); mientras que las temperaturas cardinales para la germinación de las semillas en rango térmico subóptimo (temperatura de base  $-T_b-$  y temperatura óptima  $-T_o-$ ) se consideran constantes para toda la población de semillas. Así, el tiempo térmico en el rango térmico subóptimo ( $\theta_{sub}$ ; entre  $T_b$  y  $T_o$ ) puede calcularse para diferentes fracciones de la población ( $g$ ) de la siguiente manera:

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

donde,  $\text{tg}$  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 semillas en el rango subóptimo ( $T_b$  y  $T_o$ ) permanecen constantes durante la salida de la dormición de las mismas (Kruk y Benech-Arnold, 1998; Batlla et al., 2009; Arana et al., 2016). Sólo se calcularon parámetros para aquellos casos donde la germinación fue mayor al 10% al menos a una de las temperaturas de incubación evaluadas. La *temperatura base* " $T_b$ " se calculó de la siguiente

manera: 1) el tiempo necesario para alcanzar el 50% de germinación ( $T_{50}$ ) se determinó mediante el ajuste de un modelo logístico a los datos de germinación observados a diferentes temperaturas de incubación; 2) se graficó 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' es 0. La  $T_b$  difirió entre genotipos y se calculó para frutos que presentaron el menor nivel de dormición (i.e. cuando se observó el máximo nivel de germinación en todas las temperaturas de incubación). Las  $T_b$  para los genotipos 1552, 1579 y AAL fueron de 6.7, 0 y 4.3°C, respectivamente (Fig. S2.6). 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.



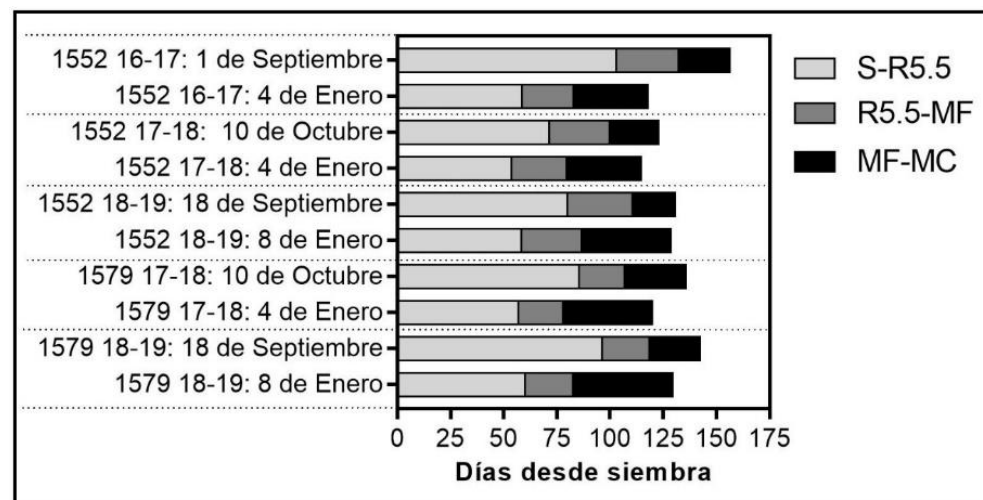
**Fig. S2. 6.** Ajustes lineales para calcular la temperatura base en cada caso. El eje X representa las temperaturas de incubación y el eje Y la tasa (inversa de los días en alcanzar el 50% de germinación de frutos). Se presentan las rectas de ajuste, el  $R^2$  y la temperatura base (cuando  $Y=0$ ).

**Figuras y cuadros suplementarios al capítulo 3.**

**Cuadro S3.1.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas en diferentes estadios ontogénicos (Schneiter y Miller, 1981) según genotipo, año y FS. Letras distintas indican diferencias significativas entre FS y año ( $p$ -valor $<$ 0.05), **siendo las comparaciones por genotipo.** Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en  $^{\circ}$ C; Fp (h): Fotoperíodo medio, en horas; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en  $\text{MJ m}^{-2}$ .

<b>Genotipo</b> <b>Año-FS</b>	<b>TMd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Fp (h)</b>	<b>RIMd</b> <b>(<math>\text{MJ m}^{-2}</math>)</b>
<b>SIEMBRA-ANTESIS</b>			
<b>1552</b>			
<i>16/17-1 de septiembre</i>	16.4 ( $\pm$ 3.9) <sup>c</sup>	13.7 ( $\pm$ 0.8) <sup>c</sup>	16.6 ( $\pm$ 7.5) <sup>d</sup>
<i>16/17-4 de enero</i>	24.7 ( $\pm$ 2.8) <sup>a</sup>	14.6 ( $\pm$ 0.5) <sup>a</sup>	20.4 ( $\pm$ 6.6) <sup>bc</sup>
<i>17/18-10 de octubre</i>	19.9 ( $\pm$ 3.4) <sup>b</sup>	14.7 ( $\pm$ 0.5) <sup>a</sup>	22.6 ( $\pm$ 7.0) <sup>ab</sup>
<i>17/18-4 de enero</i>	24.9 ( $\pm$ 2.9) <sup>a</sup>	14.7 ( $\pm$ 0.5) <sup>a</sup>	25.4 ( $\pm$ 6.2) <sup>a</sup>
<i>18/19-18 de septiembre</i>	18.6 ( $\pm$ 3.4) <sup>b</sup>	14.5 ( $\pm$ 0.6) <sup>b</sup>	19.5 ( $\pm$ 7.5) <sup>cd</sup>
<i>18/19-8 de enero</i>	23.6 ( $\pm$ 3.4) <sup>a</sup>	14.5 ( $\pm$ 0.5) <sup>ab</sup>	21.8 ( $\pm$ 6.8) <sup>bc</sup>
<b>1579</b>			
<i>17/18-10 de octubre</i>	20.7 ( $\pm$ 3.9) <sup>b</sup>	14.9 ( $\pm$ 0.6) <sup>a</sup>	22.9 ( $\pm$ 7.3) <sup>ab</sup>
<i>17/18-4 de enero</i>	24.9 ( $\pm$ 2.9) <sup>a</sup>	14.6 ( $\pm$ 0.5) <sup>ab</sup>	25.2 ( $\pm$ 5.9) <sup>a</sup>
<i>18/19-18 de septiembre</i>	19.3 ( $\pm$ 3.2) <sup>b</sup>	14.4 ( $\pm$ 0.8) <sup>b</sup>	19.1 ( $\pm$ 7.7) <sup>c</sup>
<i>18/19-8 de enero</i>	23.5 ( $\pm$ 3.5) <sup>a</sup>	14.4 ( $\pm$ 0.6) <sup>b</sup>	21.8 ( $\pm$ 6.4) <sup>bc</sup>
<b>ANTESIS-MF</b>			
<b>1552</b>			
<i>16/17-1 de septiembre</i>	22.8 ( $\pm$ 2.9) <sup>ab</sup>	15.3 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	25.2 ( $\pm$ 5.9) <sup>a</sup>
<i>16/17-4 de enero</i>	21.0 ( $\pm$ 2.4) <sup>bc</sup>	13.1 ( $\pm$ 0.2) <sup>b</sup>	17.0 ( $\pm$ 4.9) <sup>b</sup>
<i>17/18-10 de octubre</i>	24.7 ( $\pm$ 3.7) <sup>a</sup>	15.4 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	24.2 ( $\pm$ 9.1) <sup>a</sup>
<i>17/18-4 de enero</i>	21.4 ( $\pm$ 3.5) <sup>bc</sup>	13.2 ( $\pm$ 0.3) <sup>b</sup>	21.1 ( $\pm$ 4.2) <sup>ab</sup>
<i>18/19-18 de septiembre</i>	23.1 ( $\pm$ 2.7) <sup>ab</sup>	15.4 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	23.5 ( $\pm$ 8.6) <sup>a</sup>
<i>18/19-8 de enero</i>	19.8 ( $\pm$ 2.1) <sup>c</sup>	12.9 ( $\pm$ 0.3) <sup>c</sup>	17.0 ( $\pm$ 4.5) <sup>b</sup>
<b>1579</b>			
<i>17/18-10 de octubre</i>	25.4 ( $\pm$ 2.9) <sup>a</sup>	15.2 ( $\pm$ 0.1) <sup>b</sup>	24.7 ( $\pm$ 8.3) <sup>a</sup>
<i>17/18-4 de enero</i>	21.8 ( $\pm$ 3.1) <sup>b</sup>	13.2 ( $\pm$ 0.2) <sup>c</sup>	20.9 ( $\pm$ 4.7) <sup>ab</sup>
<i>18/19-18 de septiembre</i>	24.4 ( $\pm$ 2.2) <sup>a</sup>	15.4 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	23.0 ( $\pm$ 8.4) <sup>a</sup>
<i>18/19-8 de enero</i>	19.4 ( $\pm$ 2.8) <sup>c</sup>	13.0 ( $\pm$ 0.2) <sup>d</sup>	17.5 ( $\pm$ 4.4) <sup>b</sup>

	MF-MC			Precipitaciones (mm)
<b>1552</b>				
16/17-1 de septiembre	25.2 ( $\pm 2.2$ ) <sup>ab</sup>	15.4 ( $\pm 0.1$ ) <sup>a</sup>	21.6 ( $\pm 8.2$ ) <sup>b</sup>	158.7
16/17-4 de enero	18.4 ( $\pm 3.0$ ) <sup>d</sup>	12.3 ( $\pm 0.2$ ) <sup>d</sup>	12.1 ( $\pm 4.3$ ) <sup>c</sup>	118.4
17/18-10 de octubre	25.7 ( $\pm 1.9$ ) <sup>a</sup>	14.8 ( $\pm 0.1$ ) <sup>c</sup>	26.8 ( $\pm 4.3$ ) <sup>a</sup>	7.8
17/18-4 de enero	20.9 ( $\pm 2.7$ ) <sup>c</sup>	12.4 ( $\pm 0.2$ ) <sup>d</sup>	11.2 ( $\pm 6.3$ ) <sup>c</sup>	286.6
18/19-18 de septiembre	23.4 ( $\pm 2.6$ ) <sup>b</sup>	15.1 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>	20.6 ( $\pm 8.7$ ) <sup>b</sup>	84.8
18/19-8 de enero	17.2 ( $\pm 2.3$ ) <sup>d</sup>	11.8 ( $\pm 0.4$ ) <sup>e</sup>	11.6 ( $\pm 4.3$ ) <sup>c</sup>	126.6
<b>1579</b>				
17/18-10 de octubre	24.8 ( $\pm 3.0$ ) <sup>a</sup>	14.5 ( $\pm 0.3$ ) <sup>b</sup>	26.5 ( $\pm 4.0$ ) <sup>a</sup>	49.1
17/18-4 de enero	20.6 ( $\pm 2.9$ ) <sup>b</sup>	12.3 ( $\pm 0.3$ ) <sup>c</sup>	11.3 ( $\pm 6.5$ ) <sup>c</sup>	348.6
18/19-18 de septiembre	24.3 ( $\pm 3.1$ ) <sup>a</sup>	14.9 ( $\pm 0.2$ ) <sup>a</sup>	22.9 ( $\pm 6.9$ ) <sup>b</sup>	114.4
18/19-8 de enero	17.7 ( $\pm 2.7$ ) <sup>c</sup>	11.8 ( $\pm 0.4$ ) <sup>d</sup>	11.9 ( $\pm 4.3$ ) <sup>c</sup>	100.6



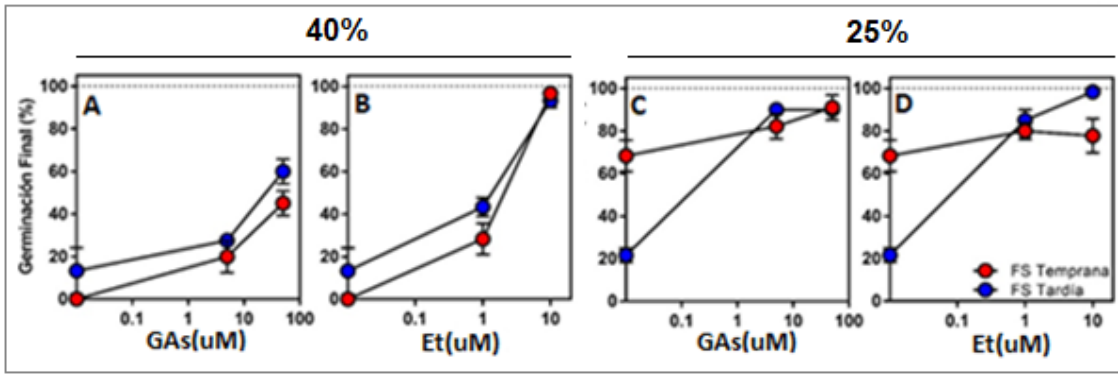
**Fig. S3.1.** Duración promedio de los estadios ontogénicos para los genotipos 1552 y 1579 según FS y año. Las etapas ontogénicas (Schneiter y Miller, 1981) son: Siembra–Antesis (S–R5.5); Antesis–MF (R5.5–MF); y MF–MC.

**Cuadro S3.2.** Descripción de datos asociados al rendimiento de los genotipos 1552 y 1579 según FS y año. Se presentan los valores medios ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p$ -valor $<0.05$ ) entre FS y años, **siendo las comparaciones por genotipo**. La duración del llenado del fruto se expresa en días desde anthesis y la tasa de llenado del fruto se estimó mediante un ajuste bilineal (Fig. 3.1), expresada en  $\text{mg d}^{-1}$ . El peso final del fruto y sus parámetros (duración y tasa de llenado) se midieron en el tercio medio del capítulo.

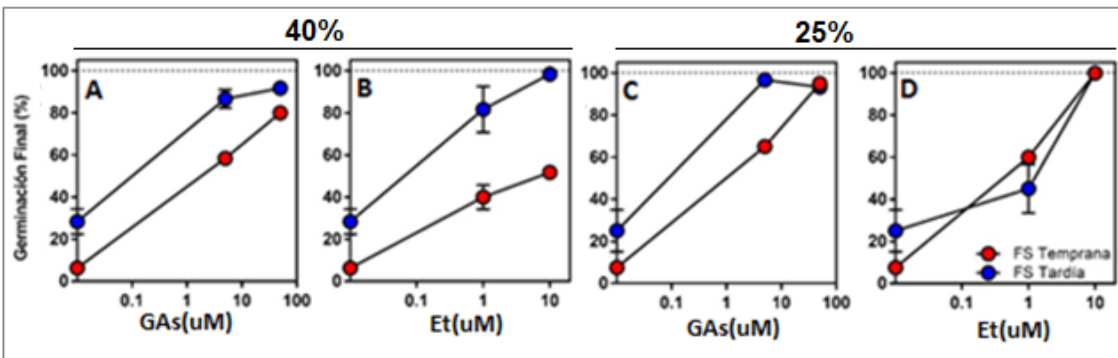
Genotipo Año-FS	Duración del llenado (d)	Tasa de llenado ( $\text{mg d}^{-1}$ )	Peso seco final del fruto (mg)	Rendimiento ( $\text{g planta}^{-1}$ )
<b>1552</b>				
<i>16/17</i>				
1 de septiembre	29.4 ( $\pm 1.4$ ) <sup>ab</sup>	2.3 ( $\pm 0.1$ ) <sup>abc</sup>	69.9 ( $\pm 3.9$ ) <sup>ab</sup>	62.5 ( $\pm 13.7$ ) <sup>a</sup>
4 de enero	23.0 ( $\pm 2.4$ ) <sup>b</sup>	1.8 ( $\pm 0.2$ ) <sup>bc</sup>	42.1 ( $\pm 2.7$ ) <sup>c</sup>	30.3 ( $\pm 8.8$ ) <sup>b</sup>
<i>17/18</i>				
10 de octubre	30.7 ( $\pm 3.5$ ) <sup>a</sup>	2.4 ( $\pm 0.4$ ) <sup>ab</sup>	71.1 ( $\pm 12.4$ ) <sup>a</sup>	57.8 ( $\pm 12.8$ ) <sup>a</sup>
4 de enero	28.2 ( $\pm 1.8$ ) <sup>ab</sup>	2.5 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	68.1 ( $\pm 12.4$ ) <sup>ab</sup>	29.3 ( $\pm 6.3$ ) <sup>b</sup>
<i>18/19</i>				
18 de septiembre	28.2 ( $\pm 3.0$ ) <sup>ab</sup>	1.8 ( $\pm 0.3$ ) <sup>abc</sup>	51.2 ( $\pm 2.4$ ) <sup>bc</sup>	59.1 ( $\pm 10.3$ ) <sup>a</sup>
8 de enero	26.0 ( $\pm 2.7$ ) <sup>ab</sup>	1.7 ( $\pm 0.1$ ) <sup>c</sup>	44.6 ( $\pm 5.7$ ) <sup>c</sup>	34.9 ( $\pm 14.2$ ) <sup>b</sup>
<b>1579</b>				
<i>17/18</i>				
10 de octubre	22.2 ( $\pm 1.1$ ) <sup>a</sup>	1.8 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>	39.9 ( $\pm 3.0$ ) <sup>b</sup>	52.8 ( $\pm 5.9$ ) <sup>a</sup>
4 de enero	22.4 ( $\pm 1.9$ ) <sup>a</sup>	2.5 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	56.2 ( $\pm 7.6$ ) <sup>a</sup>	32.7 ( $\pm 9.8$ ) <sup>b</sup>
<i>18/19</i>				
18 de septiembre	21.2 ( $\pm 2.3$ ) <sup>a</sup>	1.8 ( $\pm 0.3$ ) <sup>b</sup>	37.1 ( $\pm 4.4$ ) <sup>b</sup>	40.7 ( $\pm 6.9$ ) <sup>b</sup>
8 de enero	20.9 ( $\pm 1.9$ ) <sup>a</sup>	1.6 ( $\pm 0.4$ ) <sup>b</sup>	34.4 ( $\pm 9.0$ ) <sup>b</sup>	18.3 ( $\pm 3.8$ ) <sup>c</sup>

**Cuadro S3.3.** Caracterización del secado de los frutos de los genotipos 1552 y 1579 en ambas FS y años evaluados. Se presentan valores promedio ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Las tasas de secado se calcularon a través de un modelo lineal y bilineal, para las FS tempranas y tardías, respectivamente (Fig. 3.2).

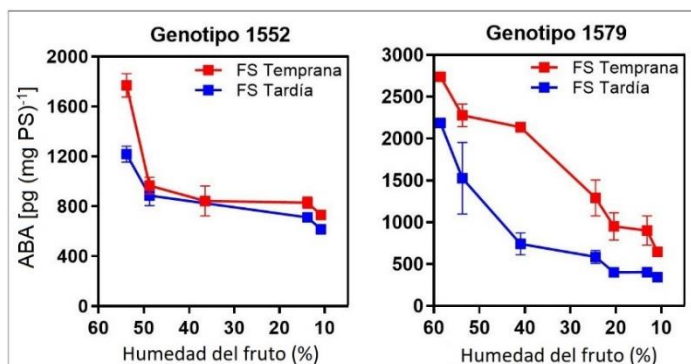
Genotipo Año-FS	Tasa secado inicial ( $\% \text{d}^{-1}$ )	Punto de quiebre entre tasas de secado (días desde R5.5)	Tasa secado final ( $\% \text{d}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>
<b>1552</b>				
16/17 - 1 de septiembre	-2.3 ( $\pm 0.1$ )			0.98
16/17 - 4 de enero	-1.8 ( $\pm 0.01$ )	42 ( $\pm 1.1$ )	-0.8 ( $\pm 0.1$ )	0.98
17/18 - 10 de octubre	-1.9 ( $\pm 0.2$ )	40 ( $\pm 1.4$ )	-1.2 ( $\pm 0.2$ )	0.99
17/18 - 4 de enero	-1.7 ( $\pm 0.1$ )	42 ( $\pm 2.5$ )	-0.7 ( $\pm 0.1$ )	0.97
18/19 - 18 de septiembre	-1.9 ( $\pm 0.1$ )			0.99
18/19 - 8 de enero	-1.9 ( $\pm 0.1$ )	45 ( $\pm 2.2$ )	-0.5 ( $\pm 0.1$ )	0.98
<b>1579</b>				
17/18 - 10 de octubre	-1.8 ( $\pm 0.2$ )			0.99
17/18 - 4 de enero	-1.8 ( $\pm 0.1$ )	45 ( $\pm 2.1$ )	-0.4 ( $\pm 0.1$ )	0.99
18/19 - 18 de septiembre	-2.2 ( $\pm 0.1$ )			0.98
18/19 - 8 de enero	-2.0 ( $\pm 0.2$ )	40 ( $\pm 3.5$ )	-0.5 ( $\pm 0.1$ )	0.98



**Fig. S3.2.** Porcentaje final de germinación de embriones del genotipo 1552 (año 18/19), incubados a 25°C, en función de la concentración de GAs (A y C) y etefón (B y D), según FS, provenientes de frutos en desarrollo de 40% y 25% de humedad. Los puntos rojos representan a las FS tempranas y los azules, a las FS tardías. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como  $x=0$  están graficados como  $x=0.01$ , y representan a embriones incubados en agua destilada.

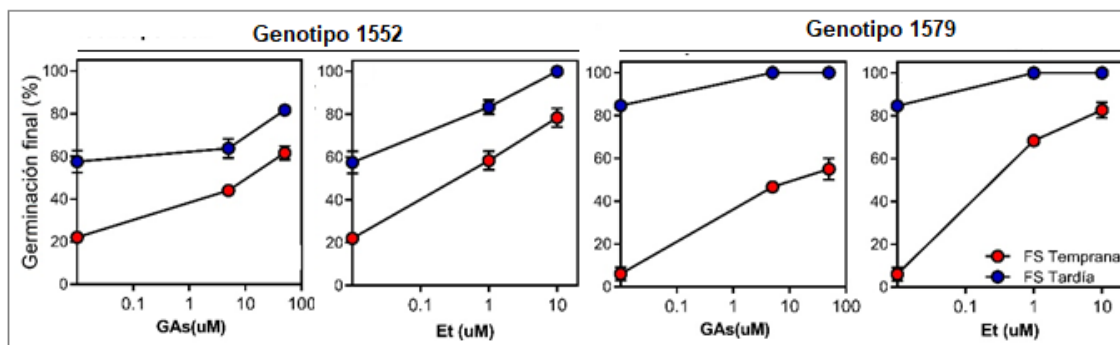


**Fig. S3.3.** Porcentaje final de germinación de embriones del genotipo 1579 (año 18/19), incubados a 25°C, en función de la concentración de GAs (A y C) y etefón (B y D), según FS, provenientes de frutos en desarrollo de 40% y 25% de humedad. Los puntos rojos representan a las FS tempranas y los azules, a las FS tardías. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como  $x=0$  están graficados como  $x=0.01$ , y representan a embriones incubados en agua destilada.

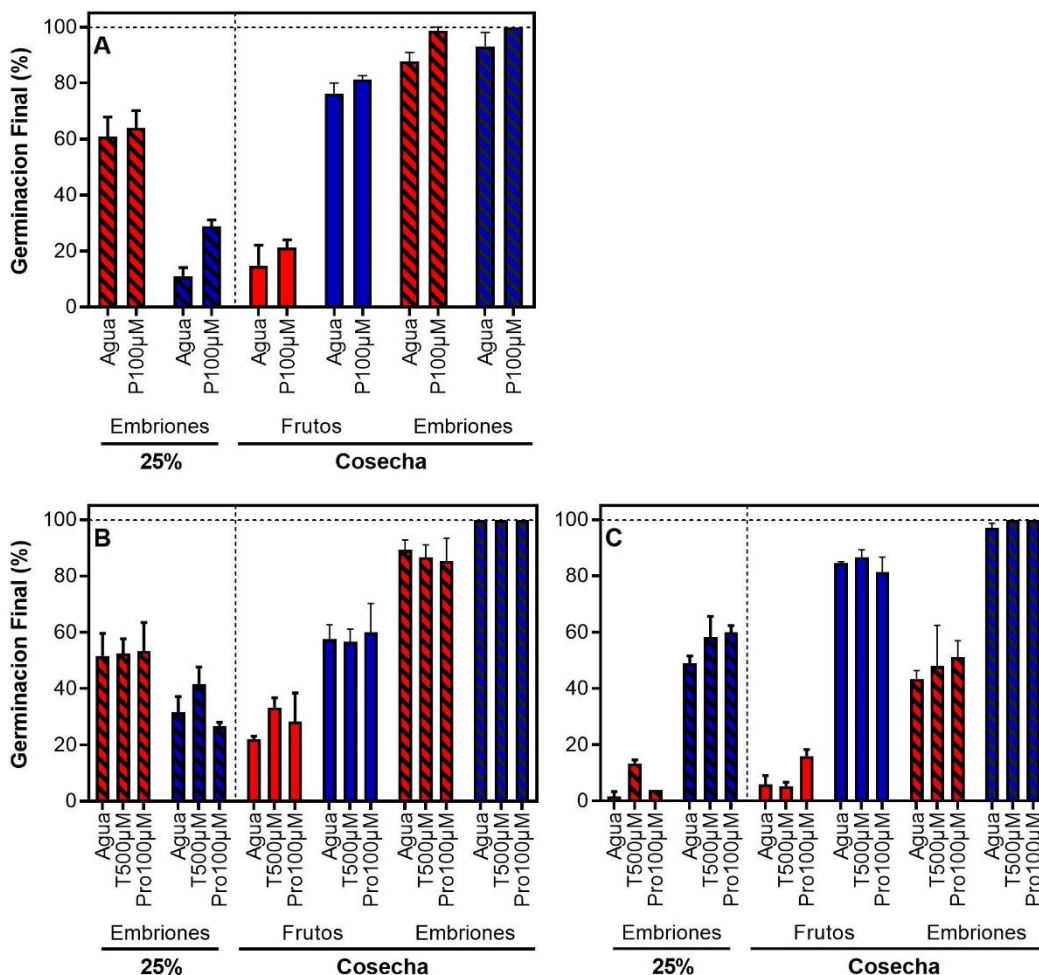


**Fig. S3.4.** Contenido endógeno de ABA ( $\text{pg ABA mg PS}^{-1}$ ) en función del porcentaje de humedad de frutos en ejes embrionarios extraídos de frutos provenientes de FS tempranas (líneas rojas) y FS tardías (líneas azules) para los dos genotipos en la campaña 18/19. Los puntos indican la media del contenido endógeno de ABA y de germinación de embriones ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. La cosecha ocurrió en ambos genotipos y FS con una humedad de los frutos cercana a 11%.

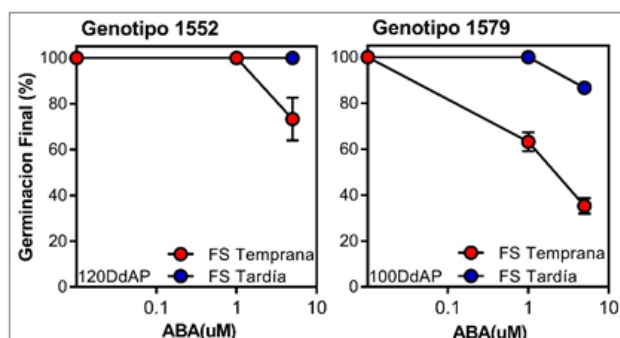




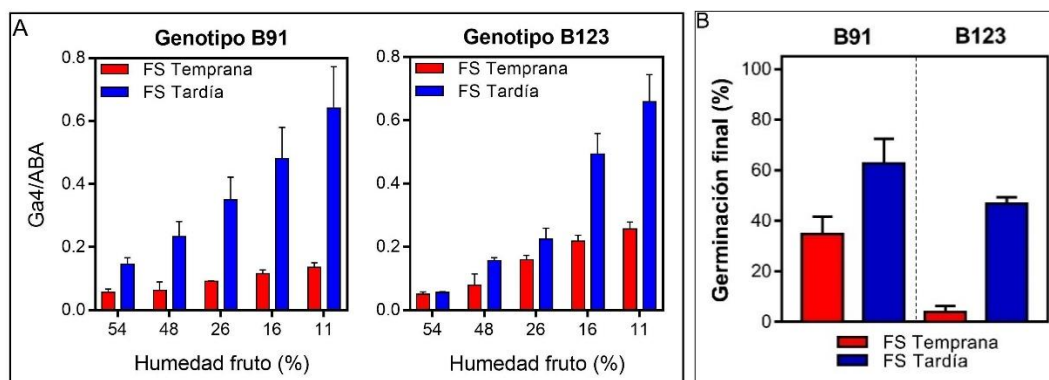
**Fig. S3.5.** Porcentaje final de germinación de frutos de genotipos 1552 y 1579 incubados a 25°C en función de la concentración de GAs y etefón, a cosecha, según FS. Los puntos rojos representan a las FS tempranas y los azules, a las FS tardías. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm\text{EE}$ , n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como x=0 están graficados como x=0.01, y representan a embriones incubados en agua destilada.



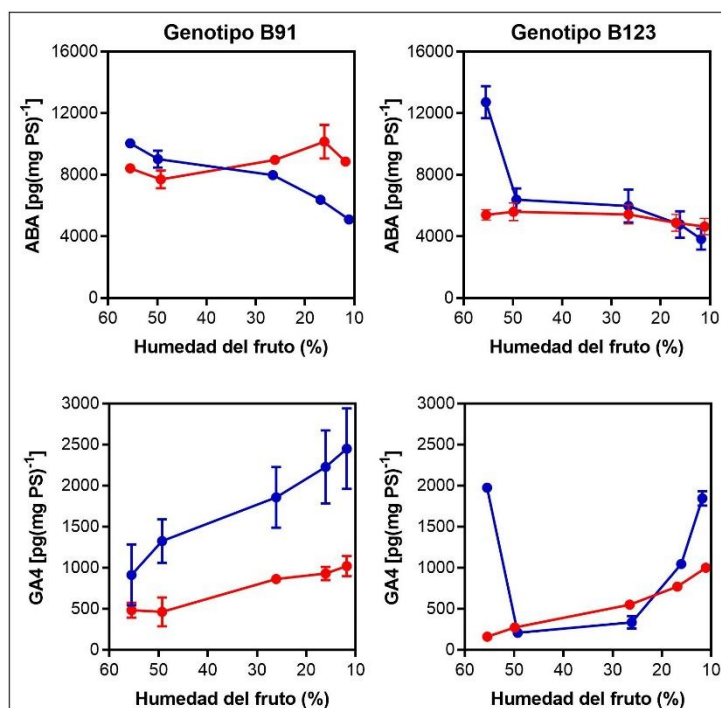
**Fig. S3.6.** Porcentaje final de germinación de frutos y embriones en desarrollo (25% de humedad del fruto) y a cosecha, según corresponda, incubados a 25°C en agua y en distintas soluciones que inhiben la síntesis de GAs (P100 $\mu\text{M}$ : Paclobutrazol 100 $\mu\text{M}$ ; T500 $\mu\text{M}$ : Trinexapac 500 $\mu\text{M}$ ; Pro100 $\mu\text{M}$ : Prohexadione-Ca 100 $\mu\text{M}$ ), en los genotipos 1552 16-17 (A), 1552 17-18 (B), 1579 17-18 (C). Las barras rojas representan a las FS tempranas y las azules, a las FS tardías. Las barras con líneas diagonales indican los embriones y las barras llenas los frutos. Se indican los valores medios de germinación ( $\pm\text{EE}$ , n=3).



**Fig. S3.7.** Porcentaje final de germinación de embriones de los genotipos 1552 y 1579 (año 17/18) incubados a 10°C en función de la concentración de ABA, para diferentes momentos durante el almacenaje post-cosecha (DdAP), según FS. Los puntos rojos representan a las FS tempranas y los azules, a las FS tardías. Los puntos indican la media de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Los puntos que se muestran como  $x=0$  están graficados como  $x=0.01$ , y representan a embriones incubados en agua destilada.



**Fig. S3.8.** A. Balance hormonal entre las GA4 y ABA en función del porcentaje de humedad de frutos en ejes embrionarios extraídos de frutos provenientes de FS tempranas (barras rojas) y FS tardías (barras azules) en la campaña 17/18, para dos genotipos con niveles contrastantes de dormición (Andrade et al., 2015; Roselló et al., 2016; Vigliocco et al., 2017): B91 y B123. Las barras indican la media del balance hormonal ( $\pm$ EE,  $n=2$ ). La cosecha ocurrió en ambos genotipos y FS con una humedad de los frutos cercana a 11%. B. Porcentaje final de germinación de frutos a cosecha, incubados a 25°C, según FS y genotipo contrastante. Las barras rojas representan a las FS tempranas y las azules, a las FS tardías. Las barras indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ).



**Fig. S3.9.** Contenido endógeno de ABA y GA4 en función del porcentaje de humedad de frutos en ejes embrionarios extraídos de frutos provenientes de FS tempranas (barras rojas) y FS tardías (barras azules) en la campaña 17/18, para dos genotipos con niveles contrastantes de dormición (Andrade et al., 2015; Roselló et al., 2016; Vigliocco et al., 2017): B91 y B123. Las barras indican la media del contenido endógeno ( $\pm$ EE, n=2).

### Figuras y cuadros suplementarios al capítulo 4.

**Cuadro S4.1.** Valores medios ( $\pm$ DE) de tasa fotosintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ) y contenido relativo de agua (% , CRA) según FS y tratamiento térmico. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ), cuando la interacción entre los factores es significativa.

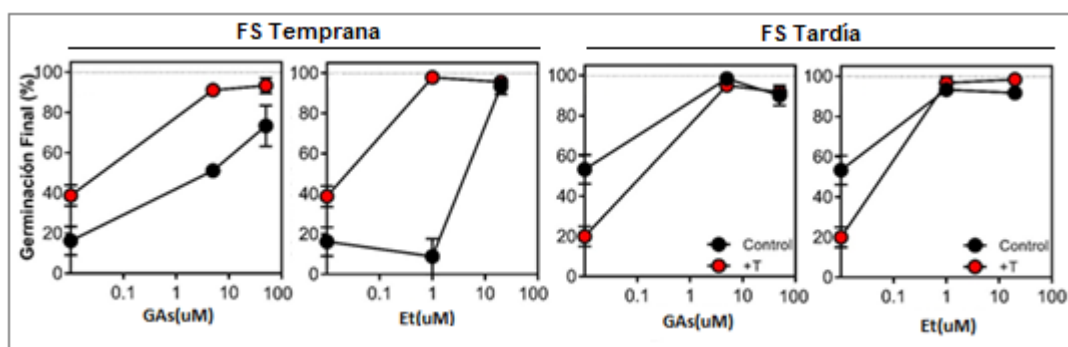
FS– Tratamiento	Tasa fotosintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ )	Temperatura durante la medición ( $^{\circ}\text{C}$ )	CRA (%)
FSTe–C	33.5 ( $\pm$ 5.0)	33.0 ( $\pm$ 0.1)	48.0 ( $\pm$ 6.1) <sup>b</sup>
FSTe–T	28.3 ( $\pm$ 7.6)	34.0 ( $\pm$ 0.6)	43.0 ( $\pm$ 6.6) <sup>b</sup>
FSTa–C	17.7 ( $\pm$ 6.3)	26.4 ( $\pm$ 0.4)	50.7 ( $\pm$ 5.2) <sup>b</sup>
FSTa–T	17.3 ( $\pm$ 6.5)	28.2 ( $\pm$ 0.4)	61.5 ( $\pm$ 7.9) <sup>a</sup>

**Cuadro S4.2.** Caracterización del llenado de los genotipos según FS y tratamiento térmico. Se presentan valores promedio ( $\pm$ DE, n=3). La interacción entre FS y Temperatura no fue significativa ( $\alpha>0.05$ ).

FS– Tratamiento	Duración del llenado (d)	Tasa de llenado ( $\text{mg d}^{-1}$ )	Peso seco final del fruto (mg)
FSTe–C	33.3 ( $\pm$ 1.9)	1.8 ( $\pm$ 0.2)	56.1 ( $\pm$ 3.2)
FSTe–T	30.4 ( $\pm$ 0.7)	1.8 ( $\pm$ 0.1)	52.7 ( $\pm$ 5.2)
FSTa–C	31.2 ( $\pm$ 4.6)	2.1 ( $\pm$ 0.5)	63.6 ( $\pm$ 4.7)
FSTa–T	31.7 ( $\pm$ 3.1)	1.6 ( $\pm$ 0.2)	57.4 ( $\pm$ 5.7)

**Cuadro S4.3.** Caracterización del secado de los frutos según FS y tratamiento térmico. Se presentan valores promedio de las tasas de secado ( $\pm$ DE, n=3). Las tasas de secado se calcularon a través de un modelo lineal y bilineal, para las FS tempranas y tardías, respectivamente.

FS– Tratamiento	Tasa secado inicial ( $\% \text{ d}^{-1}$ )	Punto de quiebre entre tasas de secado (días desde R5.5)	Tasa secado final ( $\% \text{ d}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>
FSTe–C	-1.7 ( $\pm$ 0.2)	45 ( $\pm$ 3.0)	-1.3 ( $\pm$ 0.1)	0.95
FSTe–T	-1.7 ( $\pm$ 0.1)	-	-	0.98
FSTa–C	-1.6 ( $\pm$ 0.1)	45 ( $\pm$ 2.7)	-0.6 ( $\pm$ 0.1)	0.97
FSTa–T	-1.6 ( $\pm$ 0.1)	47 ( $\pm$ 1.8)	-0.6 ( $\pm$ 0.2)	0.95



**Fig. S4. 1.** Porcentaje final de germinación de embriones, incubados a 25 $^{\circ}\text{C}$ , en función de la concentración de GAs y etefón, según FS y tratamiento térmico, provenientes de frutos en desarrollo de 25% de humedad. Los puntos negros representan al tratamiento control, mientras que los rojos, al tratamiento +T. Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE, n=3). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### Figuras y cuadros suplementarios al capítulo 5.

**Cuadro S5.1.** Valores medios ( $\pm$ DE) de las variables ambientales registradas en el período Antesis–MF y MF–MC, según experimento y tratamiento FD. En el E1 hay dos registros por cada variable ambiental, según provengan de la medición realizada fuera o dentro de la media sombra (\*). Abreviaturas: TMd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMxd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Máxima diaria, en  $^{\circ}$ C; TMMnd ( $^{\circ}$ C): Temperatura Media Mínima diaria, en  $^{\circ}$ C; RIMd ( $\text{MJ m}^{-2}$ ): Radiación Incidente Media diaria, en  $\text{MJ m}^{-2}$ .

<b>Experimento – Tratamiento FD</b>	<b>TMd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>TMMxd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>TMMnd (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>RIMd (<math>\text{MJ m}^{-2}</math>)</b>
<b>ANTESIS–MF</b>				
E1 – Defoliado	24.3 ( $\pm$ 4.0)	29.6 ( $\pm$ 5.3)	18.4 ( $\pm$ 3.5)	25.5 ( $\pm$ 8.1)
E1 – Sombreo	24.3 ( $\pm$ 3.8)	29.7 ( $\pm$ 4.9)	18.3 ( $\pm$ 3.3)	25.3 ( $\pm$ 8.9)
E1 – Sombreo (canopeo)*	21.4 ( $\pm$ 2.6)	25.2 ( $\pm$ 3.1)	16.7 ( $\pm$ 3.6)	8.9 ( $\pm$ 2.3)
E1 – Control	24.9 ( $\pm$ 3.8)	30.3 ( $\pm$ 4.7)	19.1 ( $\pm$ 3.6)	25.2 ( $\pm$ 8.6)
E1 – Desgranado	24.9 ( $\pm$ 3.8)	30.3 ( $\pm$ 4.7)	19.2 ( $\pm$ 3.6)	25.2 ( $\pm$ 8.6)
E2 – Defoliado	25.3 ( $\pm$ 3.3)	31.1 ( $\pm$ 4.0)	19.7 ( $\pm$ 3.3)	24.0 ( $\pm$ 9.4)
E2 – Control	25.2 ( $\pm$ 3.2)	30.9 ( $\pm$ 4.0)	19.7 ( $\pm$ 3.3)	24.8 ( $\pm$ 8.4)
E2 – Desgranado	25.2 ( $\pm$ 2.9)	30.9 ( $\pm$ 3.7)	19.8 ( $\pm$ 3.0)	25.3 ( $\pm$ 7.8)
E3 – Defoliado	25.0 ( $\pm$ 1.8)	29.7 ( $\pm$ 1.8)	20.2 ( $\pm$ 2.4)	23.9 ( $\pm$ 7.7)
E3 – Control	24.5 ( $\pm$ 2.3)	29.1 ( $\pm$ 2.5)	19.7 ( $\pm$ 2.9)	23.6 ( $\pm$ 8.2)
E3 – Desgranado	24.2 ( $\pm$ 2.2)	28.7 ( $\pm$ 2.5)	19.7 ( $\pm$ 2.6)	22.6 ( $\pm$ 8.7)
18/19 – Alta Densidad	25.1 ( $\pm$ 3.2)	30.2 ( $\pm$ 3.6)	19.9 ( $\pm$ 3.4)	23.5 ( $\pm$ 6.2)
18/19 – Raleo	24.4 ( $\pm$ 3.5)	29.5 ( $\pm$ 3.9)	19.2 ( $\pm$ 3.8)	22.9 ( $\pm$ 6.7)
18/19 – Baja Densidad	24.8 ( $\pm$ 3.3)	29.8 ( $\pm$ 3.7)	19.6 ( $\pm$ 3.4)	23.9 ( $\pm$ 6.1)
<b>MF–MC</b>				
E1 – Defoliado	25.1 ( $\pm$ 3.2)	30.8 ( $\pm$ 4.0)	19.9 ( $\pm$ 3.1)	24.7 ( $\pm$ 8.3)
E1 – Sombreo	25.4 ( $\pm$ 2.8)	31.0 ( $\pm$ 3.6)	20.5 ( $\pm$ 2.7)	25.6 ( $\pm$ 6.7)
E1 – Sombreo (canopeo)*	22.3 ( $\pm$ 2.1)	27.5 ( $\pm$ 3.2)	18.9 ( $\pm$ 2.6)	8.5 ( $\pm$ 1.7)
E1 – Control	25.2 ( $\pm$ 2.5)	30.8 ( $\pm$ 3.5)	20.3 ( $\pm$ 2.3)	25.6 ( $\pm$ 6.4)
E1 – Desgranado	25.2 ( $\pm$ 2.6)	30.9 ( $\pm$ 3.5)	20.3 ( $\pm$ 2.4)	26.1 ( $\pm$ 6.0)
E2 – Defoliado	26.0 ( $\pm$ 2.3)	31.8 ( $\pm$ 3.0)	21.0 ( $\pm$ 2.3)	27.6 ( $\pm$ 3.0)
E2 – Control	25.0 ( $\pm$ 3.1)	30.5 ( $\pm$ 3.4)	19.8 ( $\pm$ 3.5)	26.7 ( $\pm$ 3.8)
E2 – Desgranado	25.3 ( $\pm$ 3.2)	30.9 ( $\pm$ 3.4)	19.9 ( $\pm$ 3.7)	26.5 ( $\pm$ 3.9)
E3 – Defoliado	24.1 ( $\pm$ 3.3)	28.5 ( $\pm$ 3.8)	19.8 ( $\pm$ 3.2)	21.4 ( $\pm$ 8.1)
E3 – Control	24.4 ( $\pm$ 3.1)	29.1 ( $\pm$ 3.8)	19.5 ( $\pm$ 3.2)	23.0 ( $\pm$ 7.1)
E3 – Desgranado	24.8 ( $\pm$ 3.2)	29.7 ( $\pm$ 3.7)	19.7 ( $\pm$ 3.3)	23.7 ( $\pm$ 5.9)
E4 – Alta Densidad	22.4 ( $\pm$ 4.0)	27.4 ( $\pm$ 4.3)	17.4 ( $\pm$ 4.3)	20.8 ( $\pm$ 6.5)
E4 – Raleo	22.9 ( $\pm$ 3.9)	28.0 ( $\pm$ 4.2)	17.8 ( $\pm$ 4.4)	20.8 ( $\pm$ 6.1)
E4 – Baja Densidad	22.6 ( $\pm$ 3.9)	27.6 ( $\pm$ 4.2)	17.6 ( $\pm$ 4.3)	20.6 ( $\pm$ 6.4)

\*El sombreo artificial representó un 65.7% y 66.6% de restricción de la radiación incidente en los estadios R5.5–MF y MF–MC, respectivamente, en relación a la radiación incidente sobre los capítulos Control.

**Cuadro S5.2.** Caracterización del llenado de los genotipos según año y tratamiento de FD. Se presentan valores promedio ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Letras diferentes indican diferencia significativa entre medias de tratamientos de FD ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza y el posterior Test de Tukey fue realizado por genotipo y por año.

Experimento – Tratamiento FD	Duración del llenado (d)	Tasa de llenado (mg d <sup>-1</sup> )	Peso seco final del fruto (mg)
E1 – Defoliado	18.3 ( $\pm$ 2.0) <sup>b</sup>	1.9 ( $\pm$ 0.4) <sup>b</sup>	34.5 ( $\pm$ 5.4) <sup>d</sup>
E1 – Sombreo	22.0 ( $\pm$ 1.3) <sup>b</sup>	2.7 ( $\pm$ 0.3) <sup>ab</sup>	55.5 ( $\pm$ 7.9) <sup>c</sup>
E1 – Control	27.6 ( $\pm$ 1.4) <sup>a</sup>	2.6 ( $\pm$ 0.4) <sup>ab</sup>	71.2 ( $\pm$ 7.0) <sup>b</sup>
E1 – Desgranado	28.2 ( $\pm$ 3.1) <sup>a</sup>	2.8 ( $\pm$ 0.3) <sup>a</sup>	78.3 ( $\pm$ 4.9) <sup>a</sup>
E2 – Defoliado	16.1 ( $\pm$ 3.0) <sup>b</sup>	2.1 ( $\pm$ 0.3) <sup>a</sup>	34.3 ( $\pm$ 4.4) <sup>c</sup>
E2 – Control	22.1 ( $\pm$ 3.3) <sup>ab</sup>	2.0 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	44.0 ( $\pm$ 7.1) <sup>b</sup>
E2 – Desgranado	27.1 ( $\pm$ 2.9) <sup>a</sup>	2.0 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	55.1 ( $\pm$ 4.8) <sup>a</sup>
E3 – Defoliado	16.2 ( $\pm$ 3.6) <sup>b</sup>	1.7 ( $\pm$ 0.4) <sup>a</sup>	29.4 ( $\pm$ 7.6) <sup>c</sup>
E3 – Control	19.1 ( $\pm$ 2.4) <sup>ab</sup>	1.9 ( $\pm$ 0.2) <sup>a</sup>	37.7 ( $\pm$ 5.4) <sup>b</sup>
E3 – Desgranado	24.1 ( $\pm$ 0.8) <sup>a</sup>	2.1 ( $\pm$ 0.2) <sup>a</sup>	51.3 ( $\pm$ 3.2) <sup>a</sup>
E4 – Alta Densidad	22.5 ( $\pm$ 3.1) <sup>a</sup>	1.8 ( $\pm$ 0.2) <sup>b</sup>	41.8 ( $\pm$ 6.9) <sup>c</sup>
E4 – Raleo	23.4 ( $\pm$ 1.9) <sup>a</sup>	2.1 ( $\pm$ 0.1) <sup>ab</sup>	47.6 ( $\pm$ 5.5) <sup>b</sup>
E4 – Baja Densidad	24.0 ( $\pm$ 1.0) <sup>a</sup>	2.3 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	55.7 ( $\pm$ 7.4) <sup>a</sup>

**Cuadro S5.3.** Caracterización del secado de los genotipos según año y tratamiento de FD. Se presenta la tasa de secado obtenida tras ajustar un modelo lineal a los datos de humedad ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Letras diferentes indican diferencia significativa entre medias de tratamientos de FD ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza y el posterior Test de Tukey fue realizado por genotipo y por año.

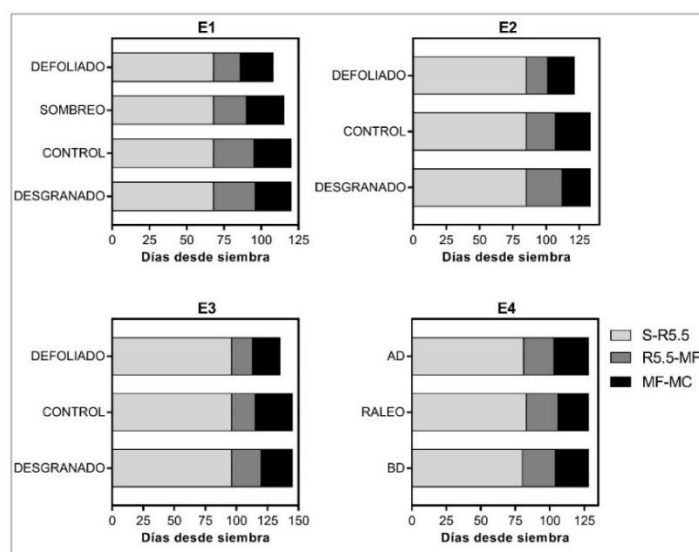
Experimento – Tratamiento FD	Tasa de secado (% d <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
E1 – Defoliado	2.9 ( $\pm$ 0.3) <sup>a</sup>	0.96
E1 – Sombreo	2.2 ( $\pm$ 0.2) <sup>b</sup>	0.97
E1 – Control	1.9 ( $\pm$ 0.1) <sup>c</sup>	0.99
E1 – Desgranado	2.0 ( $\pm$ 0.1) <sup>c</sup>	0.99
E2 – Defoliado	3.3 ( $\pm$ 0.2) <sup>a</sup>	0.98
E2 – Control	2.0 ( $\pm$ 0.1) <sup>b</sup>	0.99
E2 – Desgranado	2.0 ( $\pm$ 0.1) <sup>b</sup>	0.99
E3 – Defoliado	2.7 ( $\pm$ 0.2) <sup>a</sup>	0.96
E3 – Control	2.2 ( $\pm$ 0.1) <sup>b</sup>	0.98
E3 – Desgranado	2.3 ( $\pm$ 0.1) <sup>b</sup>	0.98
E4 – Alta Densidad	2.5 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	0.99
E4 – Raleo	2.4 ( $\pm$ 0.1) <sup>a</sup>	0.98
E4 – Baja Densidad	2.2 ( $\pm$ 0.01) <sup>a</sup>	0.99

**Cuadro S5.4.** Rendimiento por planta (g) y por hectárea (kg ha<sup>-1</sup>) según tratamiento de densidad y raleo, del E4. Se presentan valores promedio ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Letras diferentes indican diferencia significativa entre medias de tratamientos de FD (por planta:  $p$ -valor=0.015; por hectárea:  $p$ -valor=0.014).

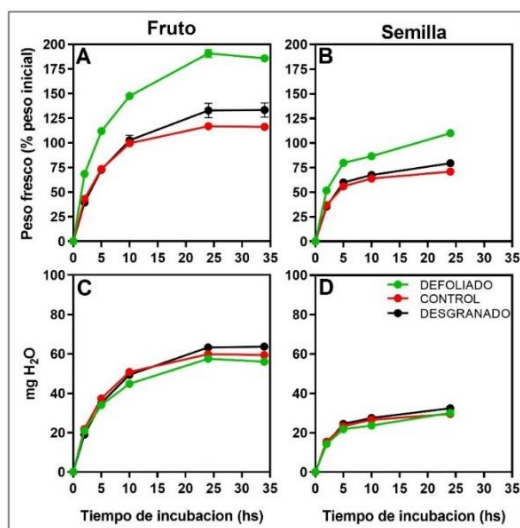
Experimento Densidad	Rendimiento por planta (g planta <sup>-1</sup> )	Rendimiento por ha (kg ha <sup>-1</sup> )
E4 – Alta Densidad	22.2 ( $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>	1553.3 ( $\pm$ 85.7) <sup>a</sup>
E4 – Raleo	29.5 ( $\pm$ 1.5) <sup>a</sup>	1033.8 ( $\pm$ 52.5) <sup>b</sup>
E4 – Baja Densidad	34.1 ( $\pm$ 2.7) <sup>a</sup>	1195.0 ( $\pm$ 93.5) <sup>b</sup>

**Cuadro S5.5.** Partición del peso total del fruto en sus componentes, pepita y pericarpio (mg) y dimensiones del pericarpio (mm) según experimento. Se presentan valores promedio ( $\pm$ EE,  $n=10$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de FD ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza y el posterior Test de Tukey fue realizado por experimento.

Experimento – Tratamiento FD	Pepita (mg)	Pericarpio (mg)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)
E1 – Defoliado	24.7 ( $\pm 4.4$ ) <sup>c</sup>	9.8 ( $\pm 1.5$ ) <sup>c</sup>	11.9 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	5.6 ( $\pm 0.3$ ) <sup>b</sup>	2.2 ( $\pm 0.2$ ) <sup>c</sup>
E1 – Sombreo	44.3 ( $\pm 6.6$ ) <sup>b</sup>	11.3 ( $\pm 1.8$ ) <sup>c</sup>	11.6 ( $\pm 0.6$ ) <sup>ab</sup>	5.5 ( $\pm 0.6$ ) <sup>b</sup>	3.1 ( $\pm 0.4$ ) <sup>b</sup>
E1 – Control	59.2 ( $\pm 5.9$ ) <sup>a</sup>	12.0 ( $\pm 1.8$ ) <sup>b</sup>	11.9 ( $\pm 0.5$ ) <sup>a</sup>	5.7 ( $\pm 0.3$ ) <sup>ab</sup>	3.6 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>
E1 – Desgranado	64.4 ( $\pm 4.1$ ) <sup>a</sup>	14.0 ( $\pm 1.4$ ) <sup>a</sup>	11.3 ( $\pm 0.3$ ) <sup>b</sup>	6.1 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	3.8 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>
E2 – Defoliado	25.5 ( $\pm 3.5$ ) <sup>c</sup>	8.8 ( $\pm 1.0$ ) <sup>b</sup>	10.4 ( $\pm 0.3$ ) <sup>b</sup>	5.9 ( $\pm 0.4$ ) <sup>ab</sup>	2.7 ( $\pm 0.2$ ) <sup>c</sup>
E2 – Control	34.4 ( $\pm 5.4$ ) <sup>b</sup>	9.6 ( $\pm 1.8$ ) <sup>b</sup>	10.7 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	5.6 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>	3.2 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>
E2 – Desgranado	41.9 ( $\pm 4.4$ ) <sup>a</sup>	13.1 ( $\pm 0.8$ ) <sup>a</sup>	11.1 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	6.1 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	3.5 ( $\pm 0.4$ ) <sup>a</sup>
E3 – Defoliado	21.5 ( $\pm 5.5$ ) <sup>c</sup>	8.0 ( $\pm 2.1$ ) <sup>b</sup>	9.7 ( $\pm 0.3$ ) <sup>b</sup>	5.0 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>	2.3 ( $\pm 0.2$ ) <sup>c</sup>
E3 – Control	28.5 ( $\pm 4.1$ ) <sup>b</sup>	9.3 ( $\pm 1.5$ ) <sup>b</sup>	9.7 ( $\pm 0.4$ ) <sup>b</sup>	5.2 ( $\pm 0.3$ ) <sup>b</sup>	3.0 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>
E3 – Desgranado	38.2 ( $\pm 2.2$ ) <sup>a</sup>	13.1 ( $\pm 1.1$ ) <sup>a</sup>	10.3 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>	5.7 ( $\pm 0.4$ ) <sup>a</sup>	3.8 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>
E4 – AD	31.2 ( $\pm 3.2$ ) <sup>b</sup>	9.2 ( $\pm 3.8$ ) <sup>b</sup>	10.4 ( $\pm 0.3$ ) <sup>b</sup>	5.5 ( $\pm 0.5$ ) <sup>ab</sup>	3.5 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>
E4 – Raleo	35.6 ( $\pm 2.6$ ) <sup>ab</sup>	11.6 ( $\pm 2.9$ ) <sup>b</sup>	10.4 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>	5.4 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>	3.5 ( $\pm 0.2$ ) <sup>b</sup>
E4 – BD	39.2 ( $\pm 7.3$ ) <sup>a</sup>	18.7 ( $\pm 5.7$ ) <sup>a</sup>	10.9 ( $\pm 0.6$ ) <sup>a</sup>	5.9 ( $\pm 0.5$ ) <sup>a</sup>	4.0 ( $\pm 0.3$ ) <sup>a</sup>



**Fig. S5. 1.** Duración promedio de los estadios ontogénicos para los distintos experimentos. Las etapas ontogénicas (Schneiter y Miller, 1981) son: siembra–Antesis (S–R5.5); Antesis–MF (R5.5–MF); y MF–cosecha (MF–MC).



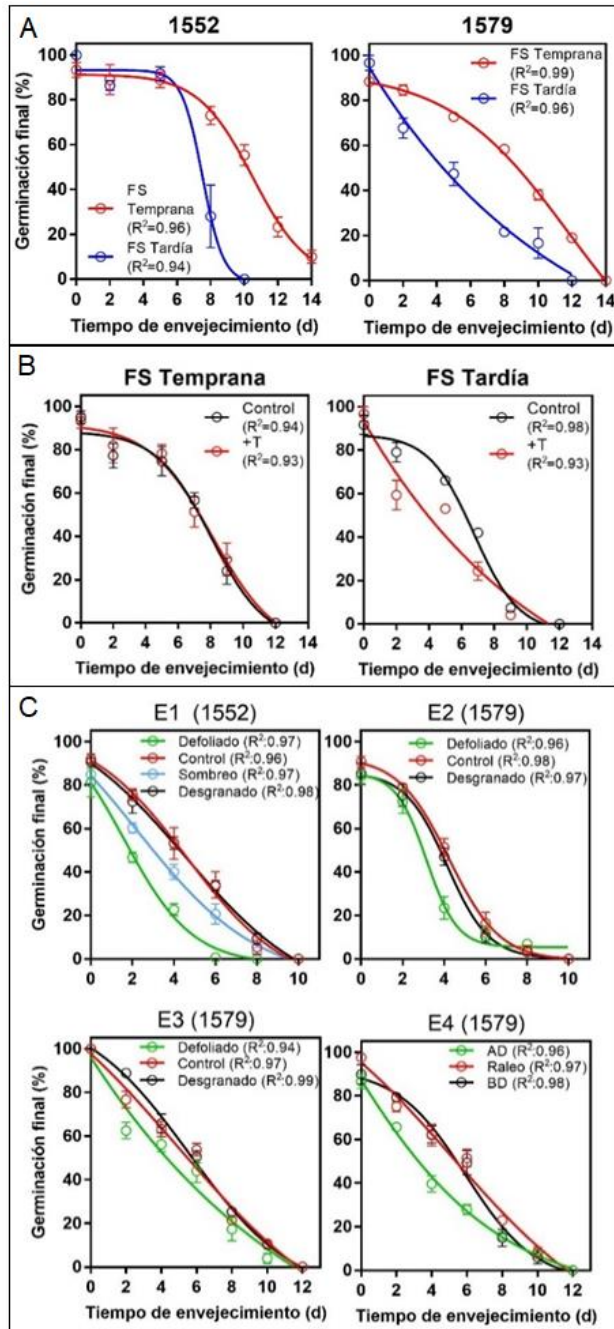
**Fig. S5.2.** Curvas de imbibición en porcentaje de peso inicial (A y B) y en cantidad de agua (C y D) de frutos y semillas incubados a 25°C durante 35 h. Los frutos se obtuvieron de los tres tratamientos de FD (Defoliado en verde, Control en rojo y Desgranado en negro) y provienen del E3. Los símbolos representan la media (n=20) y las barras verticales, el EE. Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. A las 35 y 25 horas de incubación, se observó la emergencia de la radícula y la curvatura de la radícula, respectivamente, lo que indicó el momento de germinación de ambas estructuras.

### Figuras, cuadros y notas suplementarios al capítulo 6.

#### *Envejecimiento acelerado de los frutos.*

Frutos se colocaron en tres cajas plásticas herméticas (15 cm<sup>3</sup>; n=3) conteniendo 4 frascos de vidrio con agua destilada, en una cámara a 42°C, generando dentro de cada caja una humedad relativa del 100%. Los frutos se colocaron en bolsas de voile que permiten la circulación del aire sobre una red entre medio de los frascos con agua, de modo de impedir el contacto directo de los frutos con el agua destilada. Cada 2 días de almacenaje en condiciones de deterioro (42°C y 100%HR), se extrajeron 25 frutos de cada tratamiento de AM, se les quitó el pericarpo y la cubierta seminal y se incubaron los embriones a 20°C en agua destilada. Este procedimiento se realizó con el fin de evitar la proliferación de hongos y bacterias del pericarpo, que enmascaran la capacidad germinativa del embrión. La germinación de los embriones fue registrada diariamente, hasta que el remanente de los mismos expuso síntomas de deterioro (engrosamiento de hipocótilo, curvado de radícula, signos de hongos o bacterias, pérdida de turgencia). Los datos de geminación de embriones bajo condiciones de envejecimiento acelerado fueron modelados con un ajuste sigmoideo, y se estimó el Tiempo Letal 50 (TL50), es decir el tiempo en días en que se muere el 50% de los embriones. Para realizar los análisis se utilizaron los softwares InfoStat (Di Rienzo et al., 2012) y GraphPad Prism 7 (Motulsky, 2003). Para el ensayo de FS (capítulo 3), se utilizaron frutos provenientes de la campaña 18/19 y las determinaciones se realizaron a los 300 y 320 días de almacenaje post-cosecha para los genotipos 1552 y 1579, respectivamente (Fig. S6.1A). Para el ensayo de temperatura (capítulo 4), las determinaciones se realizaron a los 350 días de almacenaje post-cosecha (Fig. S6.1B). Por último, para el ensayo de FD (capítulo 5), se utilizaron frutos provenientes de los cuatro experimentos y las determinaciones se llevaron a cabo a los 670, 640, 275 y 250 días de almacenaje post-cosecha, para los experimentos E1, E2, E3 y E4, respectivamente (Fig. S6.1C).





**Fig. S6. 1.** Porcentaje final de germinación de embriones incubados a 20°C en función de los días de exposición de los frutos a condiciones de envejecimiento acelerado (40°C y 100%HR), según **(A)** genotipo y FS (rojo, FS tempranas; azul, FS tardías), **(B)** FS y tratamiento térmico (negro, tratamiento control; rojo, alta temperatura), **(C)** experimento de FD (verde Defoliado y AD, celeste Sombreo, rojo Control y Raleo, negro Desgranado y BD). Los puntos indican el promedio de germinación ( $\pm$ EE,  $n=3$ ). Cuando las líneas de error no se muestran, el valor del EE de la media es menor que el tamaño del símbolo. Se ajustó un modelo logístico a los datos de pérdida de viabilidad a lo largo de los días de envejecimiento para calcular el tiempo letal 50 (TL50). Se exhiben los  $R^2$  como medida de ajuste del modelo a los datos de viabilidad.