

**Aspectos fisiológicos de la dormición de semillas de *Actinidia deliciosa* (Kiwi). Desarrollo de un modelo predictivo y de metodologías para su eliminación.**

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

**Matias Javier Lastuvka**

Ingeniero Agrónomo – Universidad de Buenos Aires

Lugar de trabajo: Cátedra de Fruticultura – FAUBA



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



## COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

Liliana Windauer

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

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

Co-director

Roberto Luis Benech-Arnold

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Doctor of Philosophy (University of Southampton, United Kingdom)

Consejero de Estudios

Fernando Biganzoli

Licenciado en Biología (Universidad Nacional de la Plata, Argentina)

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

## JURADO DE TESIS

Dra. Cyntia Szemruch

Cátedra de Oleaginosas

Universidad Nacional de Lomas de Zamora

Dr. Federico Mollard

Facultad de Agronomía (UBA)

IFEVA-CONICET

Dra. Raquel Iglesias Fernández

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP, UPM-INIA)

Universidad Politécnica de Madrid (UPM)

**Dedicatoria:**

A la gente que sigue buscando, aunque parezca que ya no hay nada que encontrar.

**Agradecimientos:**

A mi perro Gorren, que siempre estuvo desde el principio de este proyecto, en las buenas y en las malas.

A mi familia: mamá, papá, hermano y abuela. Por su apoyo incondicional en este camino lleno de angustias y satisfacciones. Gracias por creer en mí y por ser mi pilar fundamental en todo momento.

A mi comité consejero: Lili, Roberto y Fernando. Por su guía invaluable.

A todos y todas mis compas de la cátedra de fruticultura de todos los tiempos, que siempre me acompañaron y me ayudaron mucho.

A Coni, por ayudarme mucho en los experimentos con la c-chamber.

A Miriam Izaguirre, por ayudarme a hacer bien las cosas.

A Pedro Insausti, por enseñarme con cada palabra.

A Patri del Fueyo, Vero Rodriguez y Natalia Laspina por su predisposición y colaboración.

A toda la gente del Labo de semillas, que siempre me ayudó cuando lo necesitaba.

A Silvina Enciso por su gran trabajo cuando medimos ABA endógeno.

A mí mismo, por la perseverancia, la disciplina y el esfuerzo dedicado a alcanzar esta meta.

A los y las tesis de grado que me dieron una mano en algún momento.

A la UBA, a la EPG, al CONICET y a toda su comunidad académica, por brindarme la oportunidad de desarrollar esta investigación y crecer como profesional.

Y seguro en tantos años, que de alguien me olvido...

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.

**Ing. Agr. Matias Lastuvka**

Publicaciones derivadas de la tesis:

Matias Lastuvka, Roberto Benech-Arnold & Liliana Windauer. 2021. A stratification thermal time-based model as a tool for designing efficient methodologies to overcome seed dormancy constraints to kiwifruit seedling production. *Scientia Horticulturae* 277.

Matias Lastuvka, Roberto Benech-Arnold & Liliana Windauer. Physiological mechanisms in kiwifruit seed dormancy: GA and ABA regulation, and hypoxia participation mediated by seed coats on ABA metabolism and signaling. **En preparación.**

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xv
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. CAPITULO 1 .....	1
Introducción general: Revisión de antecedentes y presentación del problema.....	1
1.1. Introducción .....	2
1.1.1. Dormición: Antecedentes y marco teórico.....	2
1.1.2. Factores ambientales que regulan la dormición en las semillas.....	3
1.1.3. Clasificaciones de la dormición .....	4
1.1.4. Mecanismos fisiológicos que regulan la dormición en las semillas .....	5
1.1.5. El rol de las cubiertas en la dormición.....	7
1.1.6. Sobre la especie estudiada: <i>Actinidia deliciosa</i> .....	8
1.1.6.1. El análisis del caso de la dormición en semillas de <i>Actinidia deliciosa</i> . 8	8
1.1.6.2. Importancia del análisis de la dormición en <i>Actinidia deliciosa</i> .....	9
1.1.6.3. Descripción del mercado de <i>Actinidia deliciosa</i> .....	10
1.1.6.4. Origen y descripción de la especie.....	11
1.1.6.5. Descripción y desarrollo de la semilla de <i>Actinidia deliciosa</i> .....	12
1.1.6.6. Dormición en la especie estudiada.....	13
1.1.7. Modelo de “tiempo térmico de estratificación” .....	14
1.2. Objetivos e Hipótesis .....	16
1.2.1. Objetivo general .....	16
1.2.2. Objetivos Específicos.....	16

1.2.3.	Hipótesis.....	17
1.2.4.	Estructura de la tesis.....	18
2.	CAPITULO 2.....	19
	Un modelo basado en el concepto de “tiempo térmico de estratificación”: una herramienta matemática para la eliminación de la dormición a escala de vivero.....	19
2.1.	Introducción.....	21
2.2.	Materiales y métodos.....	23
2.2.1.	Material vegetal.....	23
2.2.2.	Condiciones generales y test de germinación.....	23
2.2.3.	Tratamientos.....	23
2.2.4.	Análisis estadísticos.....	24
2.2.5.	Desarrollo del modelo.....	24
2.2.6.	Evaluación del modelo.....	25
2.3.	Resultados.....	26
2.3.1.	Efecto de la temperatura de estratificación sobre los cambios en la respuesta de germinación a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas.....	26
2.3.2.	Estimación de la temperatura base de estratificación de las semillas de <i>A. deliciosa</i> 31	
2.3.3.	Desarrollo del modelo.....	32
2.3.4.	Evaluación de la coherencia interna del modelo.....	35
2.3.5.	Evaluación del modelo con datos independientes.....	36
2.4.	Discusión.....	37
3.	CAPITULO 3.....	40
	Factores endógenos involucrados en la dormición: el papel del ácido abscísico y de las giberelinas.....	40
3.1.	Introducción.....	42
3.2.	Materiales y métodos.....	45
3.2.1.	Condiciones generales.....	45

3.2.2.	Test de germinación .....	45
3.2.3.	Tratamientos.....	46
3.2.3.1.	Determinación de la respuesta a giberelinas exógenas .....	46
3.2.3.2.	Determinación del ácido abscísico endógeno .....	46
3.2.3.3.	Determinación de la respuesta al ácido abscísico exógeno en semillas con y sin cubiertas.....	47
3.2.4.	Análisis estadísticos .....	47
3.3.	Resultados .....	48
3.3.1.	Efecto de las giberelinas (GA <sub>3</sub> ).....	48
3.3.2.	Efecto del ácido abscísico .....	51
3.3.2.1.	Ácido abscísico endógeno.....	51
3.3.2.2.	Efecto y sensibilidad al ácido abscísico en semillas con y sin cubiertas	53
3.4.	Discusión.....	56
4.	CAPITULO 4.....	59
	La participación de las cubiertas de las semillas de kiwi en la disponibilidad de oxígeno para el embrión, y su relación con el contenido endógeno de ABA, la sensibilidad del embrión al ABA y el comportamiento germinativo de las semillas. ....	59
4.1.	Introducción .....	61
4.2.	Materiales y métodos .....	63
4.2.1.	Condiciones generales.....	63
4.2.2.	Test de germinación .....	65
4.2.3.	Tratamientos.....	65
4.2.3.1.	Participación de las cubiertas y efecto de la disponibilidad de oxígeno.	65
4.2.3.2.	Efecto de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno en el embrión sobre el contenido de ABA endógeno. ....	65

4.2.3.3.	Sensibilidad de las semillas al efecto inhibitor de la germinación del ácido abscísico aplicado en forma exógena: efecto de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno al embrión.....	66
4.2.4.	Análisis estadísticos .....	66
4.3.	Resultados .....	67
4.3.1.	Participación de las cubiertas y efecto de la disponibilidad de oxígeno.....	67
4.3.2.	Efecto de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno en el embrión sobre el contenido de ABA endógeno.....	70
4.3.3.	Sensibilidad de las semillas al ácido abscísico exógeno: efecto de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno al embrión.....	74
4.4.	Discusión.....	77
5.	CAPITULO 5 .....	81
	Discusión general.....	81
5.1.	Marco conceptual de la problemática abordada.....	83
5.2.	Contraste de hipótesis planteadas.....	85
5.3.	Contribución al avance del conocimiento .....	90
5.4.	Futuras líneas de investigación .....	92
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1 Porcentaje de germinación para semillas de *A. deliciosa* estratificadas a 2°C, durante diferentes periodos de tiempo (A) 7 d; (B) 11 d; (C) 14 d; (D) 18 d; (E) 21 d; (F) 25 d., en función de diferentes ciclos de temperaturas alternadas 20/30°C (0, 3, 6 y 10), e incubadas 15 días a temperaturas constantes de 25°C. Las curvas responden a la ecuación antes descripta  $Gn = C * (1 - exp - K * N) + G0$ . Las barras representan el error estándar.....28
- Figura 2.2 Porcentaje de germinación para semillas de *A. deliciosa* estratificadas a 5°C, durante diferentes periodos de tiempo (A) 7 d; (B) 11 d; (C) 14 d; (D) 18 d; (E) 21 d; (F) 25 d., en función de diferentes ciclos de temperaturas alternadas 20/30°C (0, 3, 6 y 10), e incubadas 15 días a temperaturas constantes de 25°C. Las curvas responden a la ecuación antes descripta  $Gn = C * (1 - exp - K * N) + G0$ . Las barras representan el error estándar.....29
- Figura 2.3 Porcentaje de germinación para semillas de *A. deliciosa* estratificadas a 8°C, durante diferentes periodos de tiempo (A) 7 d; (B) 11 d; (C) 14 d; (D) 18 d; (E) 21 d; (F) 25 d., en función de diferentes ciclos de temperaturas alternadas 20/30°C (0, 3, 6 y 10), e incubadas 15 días a temperaturas constantes de 25°C. Las curvas responden a la ecuación antes descripta  $Gn = C * (1 - exp - K * N) + G0$ . Las barras representan el error estándar.....30
- Figura 2.4 Curvas de respuesta de germinación de semillas de *A. deliciosa* en función del tiempo térmico de estratificación ( $S_{it}$ , °Cd) determinadas para diferentes ciclos de temperaturas alternadas de incubación (0, 3, 6 y 10). Los datos utilizados para el ajuste de la curva correspondieron a porcentajes de germinación de semillas incubadas después de diferentes días de estratificación bajo 2, 5 y 8°C. Las curvas ajustan a la ecuación antes descripta  $Gn = C * (1 - exp - K * N) + G0$ . La tabla de la esquina superior izquierda muestra el R cuadrado de cada curva. ....31
- Figura 2.5 Curvas de respuesta de germinación de semillas de *A. deliciosa* a los ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C) determinadas para diferentes valores de tiempo térmico de estratificación ( $S_{it}$ , ° Cd). Los datos utilizados para el ajuste de la curva correspondieron a porcentajes de germinación de semillas incubadas después de diferentes días de estratificación bajo 2°C, 5°C y 8°C que habían acumulado valores

similares de  $S_{tt}$ . Las curvas se ajustaron con la ecuación:  $Gn = C * (1 - \exp - K * N) + G0$ . Las barras verticales indican el error estándar. ....33

Figura 2.6 Dinámica de los coeficientes C y K en función del tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ). Los valores de C y K corresponden a los obtenidos en las curvas de respuesta a la germinación,  $Gn = C * (1 - \exp - K * N) + G0$ , de semillas de *A. deliciosa* con diferentes ciclos de temperaturas alternadas (0, 3, 6 y 10), determinado para diferentes valores de  $S_{tt}$ . Las líneas continuas corresponden a las funciones bilineales:  $C = -0,0335 + 0,0038 * S_{tt}$  ( $^{\circ}\text{Cd}$ ) (si  $S_{tt} \leq 234,1$ );  $C = 2,3314 - 0,0063 * S_{tt}$  ( $^{\circ}\text{Cd}$ ) (si  $S_{tt} > 234,1$ );  $K = -0,022 + 0,0032 * S_{tt}$  ( $^{\circ}\text{Cd}$ ) (si  $S_{tt} \leq 165$ );  $K = 0,4288 - 0,0004 * S_{tt}$  ( $^{\circ}\text{Cd}$ ) (si  $S_{tt} > 165$ ). ....34

Figura 2.7 Relación entre los porcentajes de germinación observados y el porcentaje de germinación calculado mediante las ecuaciones (2.1-2.6), en respuesta a 10 ciclos de temperaturas alternadas. La línea continua representa una relación 1:1. ....35

Figura 2.8 Curvas de respuesta de germinación de semillas de *A. deliciosa* en función del tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ,  $^{\circ}\text{Cd}$ ) determinadas para diferentes ciclos de temperaturas alternadas de incubación (0 y 10 días). Los datos utilizados para las curvas corresponden a valores predichos calculados con el modelo (símbolos abiertos), los símbolos cerrados corresponden a porcentajes de germinación de semillas incubadas durante 0, 14 y 25 días de estratificación bajo  $2^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ . Las barras verticales indican el desvío estándar. ....36

Figura 3.1. Porcentaje de germinación de las semillas en función de la concentración de giberelinas ( $\text{GA}_3$ ) para: a, c y e: semillas incubadas bajo temperaturas alternadas ( $20/30^{\circ}\text{C}$ ), y b, d y f: semillas incubadas bajo temperatura constante ( $25^{\circ}\text{C}$ ); las semillas tuvieron tres tiempos de estratificación: a y b: 0 días, c y d: 14 días y, e y f: 28 días. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas y letras diferentes significan diferencias significativas entre medias (Test de Tukey  $P \leq 0,05$ ). ....49

Figura 3.2. Contenido de ABA endógeno (pg de ácido abscísico por mg de peso seco de semilla) durante la incubación de semillas: a con 28 días de estratificación e incubación a  $20/30^{\circ}\text{C}$ , b. con 28 días de estratificación e incubación a  $25^{\circ}\text{C}$ , c. 0 días de estratificación e incubación a  $20/30^{\circ}\text{C}$ , d. 0 días de estratificación e incubación a  $25^{\circ}\text{C}$ ; medidos a las 0, 24, 120 y 168 horas de incubación. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas. ....52

Figura 3.3. Porcentaje de germinación para semillas estratificadas 28 días (28 e) y 0 días (0 e), bajo incubación con temperatura constante (25°C) y temperaturas alternadas (20/30°C). Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas.....52

Figura 3.4. Porcentaje de germinación en función de la concentración de ABA exógeno aplicado en semillas estratificadas 28 días (e28), 14 días (e14) y 0 días (e0), bajo incubación con temperaturas alternadas (20/30°C); para a: semillas con cubiertas y b: semillas sin cubiertas. Las líneas llenas se ajustaron mediante ecuaciones lineales para cada tiempo de estratificación. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas.....55

Figura 4.1: A: Semillas de kiwi sin cubiertas en placa de Petri. B: Bandejas con semillas de kiwi sin cubiertas en contenedor para tratamientos con 21% de oxígeno. C: Incubadora con cámara semi-permeable para tratamientos de hipoxia. D: Esquema demostrativo del funcionamiento del control de oxígeno para tratamientos de hipoxia (Esquema adaptado de Dominguez et al., 2019).....64

Figura 4.2 Germinación (%) para semillas incubadas bajo temperaturas alternadas (20/30°C); estratificadas 0, 14 y 28 días (0E, 14E y 28E, respectivamente), bajo concentraciones de oxígeno de 5, 10, 15 y 21% (5%O, 10%O, 15%O y 21%O, respectivamente), para A: Semillas con cubiertas y B: Semillas sin cubiertas. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas y letras diferentes significan diferencias significativas entre medias para cada gráfico (Test de Tukey  $P \leq 0,05$ ).....69

Figura 4.3 Germinación (%) para semillas incubadas con concentraciones de oxígeno de 5 y 21%, con cubiertas (c/c) y sin cubiertas (s/c), y estratificadas 0 días (0e) y 28 días (28e). Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas y letras diferentes significan diferencias significativas entre medias (Test de Tukey  $P \leq 0,05$ )... 72

Figura 4.4 Contenido de ácido abscísico (pg de ABA) por mg de peso seco de semillas), medidos a las 0, 24, 120 y 168 h de incubación a 20/30°C para A: semillas sin estratificar y B: semillas estratificadas 28 días; bajo diferentes concentraciones de oxígeno en la incubación (5 y 21%), incubadas con cubiertas (c/c) y sin cubiertas (s/c). Los porcentajes en el margen superior muestran la germinación media descrita en la figura 4.3. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas y

letras diferentes significan diferencias significativas entre medias para cada gráfico (Test de Tukey  $P \leq 0,05$ )..... 73

Figura 4.5 Porcentaje de germinación en función de la concentración de ABA exógeno aplicado ( $\mu\text{M}$ ) en semillas estratificadas 28 días (28E) e incubadas con cubiertas (C/C) y sin cubiertas (S/C), y en semillas estratificadas 0 días (0E) e incubadas sin cubiertas (S/C); todos los tratamientos bajo incubación con temperaturas alternadas (20/30°C) con concentraciones de oxígeno de: A: 5%, B: 10%, C: 15% y D: 21%. Las líneas conectan los puntos y las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas..... 76

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Datos utilizados para los grupos de curvas de respuesta de <i>A. deliciosa</i> para los diferentes ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C) determinadas para diferentes valores de tiempo térmico de estratificación, Stt (° Cd). .....	34
---	----

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados centígrados
°Cd	Grados centígrados día
%	Porcentaje
μM	Micromolar
ABA	Ácido abscísico
Alt	Alternadas
ANOVA	Análisis de varianza
C	Diferencia entre el porcentaje de germinación obtenido con 0 ciclos y N ciclos
c/c	Con cubiertas
cm	Centímetro
Cte	Constante
D	Día
ERFVII	Factor de respuesta al etileno
Exp	Experimento
g	Gramos
G <sub>0</sub>	Germinación con 0 ciclos
GA <sub>3</sub>	Giberelina 3
GAs	Giberelinas
G <sub>n</sub>	Porcentaje de germinación con N ciclos
h	Horas
K	Efecto del número de ciclos (N)
kg	Kilos
l	Litro
M	Molar
mg	Miligramos
mm	Milímetros
min	Minutos
ml	Mililitros
N	Ciclos de temperaturas alternadas
NaOH	Hidróxido de sodio
O <sub>2</sub>	Oxígeno
P	Valor p estadístico
PF	Peso fresco
pg	Picogramos
PS	Peso seco
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación estadístico
rpm	Revoluciones por minuto
s/c	Sin cubiertas
S <sub>tt</sub>	Tiempo térmico de estratificación
T <sub>b</sub>	Temperatura base de estratificación
T <sub>e</sub>	Temperatura de estratificación
v/p	Volumen/peso

## RESUMEN

La germinación de las semillas de kiwi es baja debido a la presencia de dormición. La dormición es una condición que impide la germinación de las semillas aún bajo condiciones hídricas, térmicas y gaseosas adecuadas. Sin embargo, el injerto de variedades sobre pies obtenidos de semillas es habitual en kiwi y en muchas de las especies de interés frutícola. Las semillas requieren un tiempo de estratificación húmeda a bajas temperaturas para salir de la dormición y de temperaturas alternadas para terminarla. Las hormonas involucradas en este proceso son las giberelinas (GAs) y el ácido abscísico (ABA) y además hay efectos de las cubiertas en la dormición. El objetivo del trabajo es dilucidar algunos de los mecanismos fisiológicos, que actúan en la dormición de semillas de *Actinidia deliciosa*, y desarrollar un modelo a partir del cual se puedan derivar metodologías para facilitar el manejo a escala de explotación agrícola; brindando además información para extrapolar a otras especies de comportamiento similar. Para esto, se realizaron experimentos para evaluar temperaturas de estratificación e incubación; experimentos en semillas con diferente nivel de dormición para evaluar cambios en la sensibilidad a los distintos factores terminadores de la dormición (temperaturas alternadas); experimentos con aplicación exógena de GAs y ABA para evaluar el efecto de las mismas sobre la dormición; se midió el contenido de ABA endógeno en semillas con distinto grado de dormición; se evaluó el efecto de las cubiertas de la semilla sobre la dormición mediante la remoción de las mismas y diferentes concentraciones de oxígeno en la incubación. Los resultados mostraron que temperaturas más bajas en la estratificación fueron más efectivas para aliviar la dormición, y que la incubación bajo ciclos de temperaturas alternadas fueron un requerimiento para la terminación de la misma. La aplicación de GAs redujo parcialmente el nivel de dormición, mientras que el ABA lo aumentó; el contenido de ABA endógeno de las semillas no fue concluyente sobre el nivel de expresión de la dormición. Por último, la presencia de cubiertas impuso dormición al limitar el ingreso de oxígeno al embrión, y la sensibilidad a la hipoxia y al ABA varió según el nivel de dormición y la presencia de cubiertas. Se desarrolló un modelo matemático para predecir la germinación con implicancias prácticas a escala de vivero.

## ABSTRACT

The germination of kiwi seeds is low due to the presence of dormancy. Dormancy is a condition that prevents seed germination even under adequate water, temperature, and gaseous conditions. However, grafting of varieties onto rootstocks obtained from seeds is common in kiwifruit and many other fruit species of interest. The seeds require a period of stratification at low temperatures to break dormancy and fluctuating temperatures to complete it. The hormones involved in this process are gibberellins (GAs) and abscisic acid (ABA), and there are also effects of seed coats on dormancy. The objective of this work is to elucidate some of the physiological mechanisms involved in the dormancy of *Actinidia deliciosa* seeds and to develop a model from which methodologies can be derived to facilitate management at an agricultural exploitation scale, also providing information for extrapolation to other species with similar behavior. To achieve this, experiments were conducted to evaluate stratification and incubation temperatures; experiments on seeds with different levels of dormancy to evaluate changes in sensitivity to the various dormancy-breaking factors (fluctuating temperatures); experiments with exogenous application of GAs and ABA to assess their effects on dormancy; endogenous ABA content in seeds with different levels of dormancy was measured; the effect of seed coats on dormancy was evaluated by their removal and different oxygen concentrations during incubation. The results showed that lower stratification temperatures were more effective in alleviating dormancy and that incubation under fluctuating temperature was a requirement for its termination. The application of GAs partially reduced dormancy level, while ABA increased it; the endogenous ABA content in seeds was not conclusive regarding the dormancy expression level. Finally, the presence of seed coats imposed dormancy by limiting oxygen entry to the embryo, and sensitivity to hypoxia and ABA varied according to the dormancy level and presence of seed coats. A mathematical model was developed to predict germination with practical implications at the nursery scale.

## CAPITULO 1

Introducción general: Revisión de antecedentes y  
presentación del problema

## CAPITULO 1

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

#### 1.1. Introducción

##### 1.1.1. Dormición: Antecedentes y marco teórico

Muchas semillas de especies de hábitats templados presentan dormición al momento de ser dispersadas. La dormición puede ser definida como una condición interna de las semillas que impide su germinación bajo condiciones hídricas, térmicas y gaseosas que en otras circunstancias hubieran sido adecuadas para que la germinación tenga lugar (Benech-Arnold et al., 2000; Bewley & Black, 1994). La dormición es una característica adaptativa compleja influenciada por numerosos genes y factores endógenos y ambientales que interactúan para maximizar las posibilidades de supervivencia de las plántulas resultantes de la germinación (Koorneef et al., 2002). La presencia de dormición le confiere a una especie la ventaja adaptativa de evitar la germinación hasta que estén dadas las condiciones más favorables para el establecimiento de la planta (Baskin & Baskin, 2004). Sin embargo, la dormición es un problema por resolver cuando las especies que la presentan son cultivadas, dado que la presencia de la misma determina incertidumbre acerca del momento a partir del cual las semillas podrán ser utilizadas para generar un nuevo cultivo. Es por ello, que la domesticación y el mejoramiento han tendido a eliminar este carácter presente en las semillas de las especies silvestres ancestrales (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Las especies frutales, en su mayoría bimembres, generalmente poseen portainjertos denominados “francos” que son propagados a partir de semillas que no escapan al problema de la dormición persistente. Más aún, la información disponible acerca de las bases fisiológicas y moleculares de la dormición es escasa en muchas de estas especies lo que a su vez determina que no se hayan desarrollado metodologías adecuadas para su eliminación a escala de explotación agrícola.

En algunas semillas la salida de la dormición ocurre si las mismas son almacenadas con bajo contenido de humedad y a temperaturas relativamente altas (20-30°C). Otras, requieren ser almacenadas embebidas y a bajas temperaturas (<10°C), lo que se conoce como estratificación húmeda o posmaduración (Benech-Arnold, 2007). La práctica de la estratificación húmeda, de extendida utilización en viveros frutícolas, consiste en almacenar a las semillas en un sustrato húmedo y a temperatura ambiente durante el otoño–invierno.

### **1.1.2. Factores ambientales que regulan la dormición en las semillas**

La dormición se presenta en las poblaciones de semillas en niveles variables, los cuales son regulados por factores ambientales. Estos factores pueden clasificarse en i) reguladores del nivel de dormición y ii) terminadores de la dormición (Benech-Arnold et al., 2000). Los primeros modulan el grado de dormición en una población de semillas, modificando así la sensibilidad de ésta a los estímulos ambientales y determinando los patrones estacionales de germinación. Los factores terminadores de la dormición, en cambio, promueven la germinación en poblaciones de semillas que alcanzaron niveles mínimos de dormición, removiendo los últimos impedimentos para la germinación. Si bien generalmente se considera a la temperatura del suelo como el principal factor regulador del nivel de dormición (Batlla et al., 2009; Bouwmeester & Karssen, 1992), existen estudios que sugieren que el régimen hídrico del suelo también estaría involucrado en esta función (Kruk & Benech-Arnold, 1998; Malavert et al., 2021). Estos cambios en el grado de dormición se manifiestan mediante la modificación en la amplitud de rangos de condiciones favorables para la germinación. En efecto, el rango de temperaturas permisivas para la germinación aumenta conforme el nivel de dormición disminuye y se estrecha en caso contrario (Vegis, 1964). Respecto de los factores terminadores de la dormición, entre los que se incluyen la luz y temperaturas alternadas, es preciso aclarar que no todas las especies requieren de éstos para germinar. En los casos en los cuales efectivamente se necesita de la concurrencia de estos factores, los cambios en el nivel de dormición no sólo se traducen en variaciones en los rangos de condiciones permisivas para la germinación sino también en modificaciones en la sensibilidad al efecto de los factores terminadores; esta sensibilidad aumenta en forma inversamente proporcional al nivel de dormición (Derx & Karssen, 1993; Benech-Arnold et al., 1990).

### 1.1.3. Clasificaciones de la dormición

Existen diversas clasificaciones de la dormición, Karssen (1982), sugirió que la dormición puede clasificarse en primaria y secundaria según el momento en que se adquiere. Dormición primaria, hace referencia a la dormición que presentan las semillas recién dispersadas de la planta madre. La dormición secundaria, resulta de la reinducción de la dormición en semillas ya dispersadas y que previamente han salido de la dormición primaria, cuando las mismas perciben condiciones no favorables para la germinación. Así, la salida de la dormición primaria seguida de subsecuentes reinducciones en dormición secundaria determina la existencia de ciclos en el nivel de dormición de las poblaciones de semillas (Bouwmeester & Karssen, 1992). Por otro lado, Baskin & Baskin (2004), definen a la dormición según su origen y la clasifica en fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física y una combinación de fisiológica y física. La dormición fisiológica se debe a cambios bioquímicos y moleculares en la semilla y principalmente se expresa según el rango de temperaturas al cual la semilla es capaz de germinar, ampliándose el rango en la medida que la dormición disminuye o viceversa, existiendo diferentes tipos según la especie de que se trate. Este tipo es el más abundante en la naturaleza y se registra en semillas de gimnospermas y angiospermas prevaleciendo en los bancos de semillas de hábitats templados. La mayoría de las especies utilizadas como modelos para estudiar dormición (e.g. *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Avena fatua* y varios cereales) presentan este tipo de dormición. La dormición morfológica se debe a la inmadurez del embrión al momento de la dispersión de la semilla y la morfofisiológica es una combinación de dormición fisiológica y morfológica. La dormición física se debe a la presencia de cubiertas que impiden el ingreso de agua al embrión; en este tipo de dormición la misma puede ser eliminada con una escarificación química o mecánica. Bewley & Black (1994) proponen que la dormición fisiológica puede ser causada por el embrión o impuesta por las cubiertas. En la dormición causada por el embrión, el mismo no es capaz de crecer y germinar, incluso aislado del resto de la estructura de la semilla. Por el contrario, en la dormición impuesta por las cubiertas, la semilla entera no es capaz de germinar; sin embargo, el embrión es capaz de germinar si es aislado del resto de las estructuras de la semilla. Las causas de la dormición impuesta por las cubiertas pueden deberse a una restricción a la salida de inhibidores, restricción a la entrada de agua, restricción al intercambio gaseoso, restricción mecánica a la expansión del embrión o presencia de inhibidores en las cubiertas (Bewley & Black, 1994).

#### 1.1.4. Mecanismos fisiológicos que regulan la dormición en las semillas

La dormición fisiológica está sujeta a control hormonal. Es conocido que hormonas como las giberelinas (GAs) y el ácido abscísico (ABA) están involucradas (Ali-Rachedi et al., 2004; Jacobsen et al., 2002; Kucera et al., 2005) y no sólo a través de cambios en sus niveles endógenos, sino también a través de cambios en la sensibilidad al efecto de estos reguladores (Derkx & Karssen, 1993; Nambara et al., 2010). Hay evidencia considerable de que el ácido abscísico (ABA) está involucrado en el establecimiento y mantenimiento de la dormición, determinando también la profundidad de la dormición durante el desarrollo (Debeaujon & Koorneef, 2000; Grappin et al., 2000; Bewley, 1997; Yoshioka et al., 1998). Es conocido que el ácido abscísico es un regulador positivo tanto en la inducción de la dormición durante la maduración de las semillas como en el mantenimiento de la dormición en semillas embebidas (Himmelbach et al., 2003; Bewley, 1997; Finkelstein et al., 2002). Durante el desarrollo de las semillas la acumulación de ABA es baja durante los estadios tempranos, aumenta durante el desarrollo y alcanza un máximo alrededor de madurez fisiológica (Bewley, 1997; Bewley & Black, 1994; Kermode, 2005). La salida de la dormición de las semillas se asocia con una reducción en el contenido de ABA (Millar et al., 2006), y/o la reducción de la sensibilidad del embrión al ABA (Bewley et al., 2013; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). La concentración de ABA en las semillas suele aumentar por síntesis *de novo* cuando las mismas son embebidas (Ali-Rachedi et al., 2004); sin embargo, esta capacidad se pierde (ya sea porque disminuye la capacidad de síntesis o porque aumenta la capacidad de catálisis) en semillas que han salido de la dormición por almacenamiento en seco o por estratificación, dependiendo de la especie de que se trate (Bewley & Black, 1994). Entonces, el metabolismo del ABA está regulado a través de un balance entre su síntesis y catabolismo, siendo sintetizado indirectamente a partir de precursores de carotenoides (Nambara & Marion-Poll, 2003) e interviniendo en su catabolismo la enzima ABA 8'-hidroxilasa (Cutler et al., 2000). La señalización del ABA, en cambio, es mucho más compleja que su metabolismo y sus componentes no se han identificado en su totalidad (Finkelstein et al., 2008). Estudios en *Arabidopsis thaliana* mostraron que existe un patrón diferencial de transcripción entre semillas con un alto y bajo nivel de dormición y que los eventos fisiológicos y moleculares asociados a los cambios en el nivel de dormición están principalmente correlacionados con la temperatura del suelo y la concentración y sensibilidad al ABA (Footitt et al., 2013, 2014; Footitt et al., 2011).

En cuanto a la acción de las giberelinas hay evidencias de que cumplirían un rol inverso al del ABA, actuando como promotores de la germinación; sus niveles endógenos suelen aumentar en semillas en las que el nivel de dormición disminuye (Bewley, 1997; Bewley & Black, 1994). También hay evidencia de modificaciones en la sensibilidad del embrión al efecto promotor de la germinación que producen las GAs al cabo de algunas semanas de estratificación, como también de cambios en la capacidad de sintetizar GAs *de novo* durante la incubación a temperaturas que permiten la germinación como resultado del proceso de estratificación (Benech-Arnold, 2007). Hasta el momento los mecanismos moleculares involucrados en los niveles y señalización de las giberelinas son parcialmente conocidos (Yamaguchi, 2008).

Cabe destacar que la participación de las hormonas mencionadas ha sido documentada sólo para algunas especies frutícolas de interés del género *Prunus* y *Malus* (Blake et al., 2000; Lewak, 2011). Si bien se ha avanzado mucho en el conocimiento de los cambios fisiológicos que ocurren durante la estratificación y los que ocurren en otros procesos de posmaduración, todavía es mucho lo que falta por conocer en especies frutales perennes.

### **1.1.5. El rol de las cubiertas en la dormición**

Como se mencionó anteriormente, en semillas que presentan dormición fisiológica, la misma puede estar impuesta por la presencia de las cubiertas (e.g. tejidos que recubren al embrión), impuesta directamente al embrión, o ser una combinación de ambas posibilidades. Existen diversas formas por las cuales estos mecanismos podrían estar conectados. Por ejemplo, la presencia de cubiertas podría imponer una condición de hipoxia al embrión que interferiría tanto con el metabolismo como con la señalización de inhibidores de la germinación (Bewley & Black, 1982; Benech-Arnold et al., 2006). La actividad de la enzima ABA 8'-hidroxilasa implicada en el catabolismo del ABA es severamente reducida con concentraciones de oxígeno menores a 10% (Krochko et al., 1998). Este mecanismo fue descrito para cebada, cuyo grano es un grano “vestido” ya que tiene la lemma y la pálea fuertemente adheridas al mismo. Estas estructuras son ricas en polifenoles y actúan como “trampas” de oxígeno, imponiendo hipoxia al embrión e interfiriendo tanto con el metabolismo como con la señalización del ABA (Benech-Arnold et al., 2006). También en cebada se encontró que la hipoxia impuesta por las cubiertas interfería con el metabolismo del ABA y esta interferencia sería a nivel de la transcripción de un gen que codifica para la enzima ABA 8'-hidroxilasa (Mendiondo et al., 2010).

### **1.1.6. Sobre la especie estudiada: *Actinidia deliciosa***

#### **1.1.6.1. El análisis del caso de la dormición en semillas de *Actinidia deliciosa*.**

La mayoría de los estudios que dieron lugar al conocimiento que se tiene sobre la dormición de semillas han sido realizados en modelos experimentales que abarcan desde especies monocotiledóneas hasta dicotiledóneas anuales (e.g. *Avena fatua*, *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*). Sin embargo, existen pocos modelos experimentales que hayan permitido estudiar la dormición de semillas de dicotiledóneas perennes (Blake et al., 2000; Lewak, 2011). Las semillas de kiwi representan un excelente modelo de investigación de dormición en plantas perennes debido a que cuando están recién cosechadas presentan una combinación de dormición embrionaria y dormición impuesta por cubiertas (en su conjunto denominado dormición fisiológica), alcanzando nulos porcentajes de germinación cuando recién son dispersadas por la planta madre (Samaría et al., 2011; Windauer et al., 2016).

### 1.1.6.2. Importancia del análisis de la dormición en *Actinidia deliciosa*.

La propagación de kiwi (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson) vía semilla es utilizada para obtener patrones (i.e. pies) de injerto; la mayoría de las especies de interés frutícola tienen pies obtenidos con esta metodología y por ello son denominados “pies francos”. Por la dormición que presentan las semillas de kiwi, esta técnica se torna dificultosa. Si bien la utilización de pies de injerto francos trae mayor heterogeneidad en los cultivos por la alta variabilidad genética con esta vía de reproducción, este proceso tiene sus beneficios dado que las plántulas obtenidas de esta forma tienen mejor enraizamiento que plantas obtenidas por estacas y, además, éstas últimas son más difíciles de obtener por la baja capacidad de enraizamiento que tiene el material vegetativo de esta especie. Por estas razones, obtener plantas de pies francos se traduce en un monte frutícola más vigoroso y que se adelanta en producción (Bellini & Monastra, 1986; Sale, 1985). No sólo se utilizan semillas para la multiplicación de plantas para la obtención de pies de injerto, sino que también este medio de propagación es indispensable para el cruzamiento y desarrollo de nuevas variedades. Las semillas requieren un tiempo de estratificación en húmedo y a bajas temperaturas para lograr un porcentaje de germinación aceptable (Sale, 1985; Tanimoto, 1994; Windauer et al., 2016).

### 1.1.6.3. Descripción del mercado de *Actinidia deliciosa*

La producción global de kiwi asciende a aproximadamente 3 millones de toneladas, siendo China responsable de la mitad de esta cifra. En China, la mayor parte del kiwi cultivado se destina al consumo interno, a diferencia de Nueva Zelanda, Chile y Grecia, cuya producción se orienta principalmente hacia la exportación. Italia también juega un papel importante como exportador de kiwi. El cultivar preponderante es el *A. deliciosa* var. "Hayward", un kiwi de pulpa verde que constituye alrededor de las dos terceras partes de la producción mundial (Ferguson, 2016). Las regiones más propicias para la producción de kiwi (*Actinidia deliciosa*) a nivel global por lo general se ubican entre los paralelos 30° y 45°, tanto al norte como al sur. En el hemisferio sur, se cultiva en países como Nueva Zelanda, Chile, Argentina, Uruguay y Brasil. Sudáfrica y Australia han adoptado el cultivo en fechas más recientes. La mayor parte de la producción en el hemisferio sur se destina a la exportación hacia el hemisferio norte, que constituye el principal mercado de esta fruta entre junio y diciembre. Los principales productores mundiales de kiwi por volumen son China (50%), Italia (13%), Nueva Zelanda (10%), Irán (8%), Grecia (7%) y Chile (6%), alcanzando el 94% de la producción total. (FAOSTAT, 2022). Argentina contribuye con aproximadamente el 0,20% del total mundial, según la Dirección de Cadenas Alimentarias (DCA) del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. El cultivo del kiwi comenzó a fines de la década del '80, experimentando un auge significativo en 2004 después de la finalización de la paridad cambiaria entre el peso y el dólar, lo que resultó en un aumento sustancial de la producción. El país cuenta con alrededor de 800 hectáreas plantadas con kiwi, principalmente en dos zonas de la provincia de Buenos Aires: Zona Norte (La Plata, Baradero, San Pedro) y Sudeste (General Pueyrredón, General Madariaga, General Alvarado, Balcarce y Mar Chiquita). Además, existen otras áreas de producción más pequeñas en Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba (SENASA, 2018). Aunque no hay datos oficiales, la producción anual en Argentina supera las 8.000 toneladas, dado que la producción nacional no satisface la demanda interna, Argentina ha importado un promedio de 10.595 toneladas por año durante el período 2013-2017, principalmente de Chile (65%) e Italia (34%), según el Ministerio de Agroindustria en 2020. Además, la demanda en el mercado de kiwi está en constante crecimiento, impulsada principalmente por su excelente sabor y los notables beneficios para la salud. Un solo fruto contiene aproximadamente el 230% de la vitamina C diaria requerida, el 16% de la fibra, el 13% de potasio, el 10% de la vitamina E y solo 90 calorías (USDA, 2015).

#### 1.1.6.4. Origen y descripción de la especie

El kiwi (*Actinidia deliciosa*), como todas las especies pertenecientes al género *Actinidia*, provienen del sudeste asiático en el área de distribución que está delimitada por el paralelo 51° N y el paralelo 18° N, extendiéndose desde el Tíbet hasta Japón. Aquí crece de forma natural con hábito trepador en el sotobosque.

En cuanto a su ecofisiología, es una especie caducifolia, con un requerimiento de aproximadamente 600 horas de frío (temperaturas menores a 7°C) durante el período invernal para brotar (Himelrick & Powell, 1998), y un período libre de heladas de 7 a 9 meses. Se trata de un arbusto con hábito trepador, que puede alcanzar los 10 metros de altura; posee un tallo leñoso que tiende a enroscarse sobre sí mismo y cuyas ramificaciones suelen reproducir esta misma característica; sus hojas, de entre 7,5 cm a 12,5 cm de largo, son caducas, simples, alternas y largamente pecioladas, siendo este último pubescente; la lámina es de forma variable y posee abundante pubescencia en la cara abaxial; el haz es verde oscuro y a veces brillante, mientras que el envés es verde claro y a veces grisáceo (Covatta & Borscak, 1988; Himelrick & Powell, 1998). Esta especie, a pesar de ser hermafrodita constitutivamente, se comporta como dioica por atrofia de estilos en flores funcionalmente masculinas, por lo cual se recomienda, para la producción comercial de frutos, 1 macho cada 6-8 hembras (Covatta & Borscak, 1988). Posee flores solitarias o en inflorescencias en las yemas axilares de las hojas. La polinización es entomófila y, en mucho menor medida, anemófila (Costa et al., 1993). Posee muy altos requerimientos hídricos, debido a su elevado índice de área foliar (IAF) y la consecuente pérdida de agua por transpiración por lo cual es muy sensible al déficit, sumado a que presenta una escasa profundidad radical. El fruto es una baya con forma de elipse, color marrón y cubierto de pubescencia, que puede crecer solitario o en forma de racimos.

#### **1.1.6.5. Descripción y desarrollo de la semilla de *Actinidia deliciosa***

En el caso del kiwi, la cubierta está formada por la pared del ovario (integumento) que se lignifica (Hopping, 1976). Durante la floración, el óvulo consiste en un saco embrionario incrustado en un nucelo bien definido y limitado por un tegumento uniseriado. Posteriormente y en forma progresiva el nucelo se agranda por multiplicación celular, las paredes celulares del tegumento se engrosan, la capa de células que rodea el saco embrionario se agrandan para formar un endotelio visible. Dentro del endotelio se desarrolla un endospermo que eventualmente se somete a múltiples divisiones para producir una masa de células pequeñas de paredes delgadas. Después de la fertilización, el embrión, que está ubicado en el extremo micropilar del saco embrionario, se divide y luego permanece inactivo durante al menos 60 días. Entre 60 y 110 días después de la floración, el embrión crece hasta su tamaño máximo (Hopping, 1976).

#### **1.1.6.6. Dormición en la especie estudiada**

Es conocido que las semillas de kiwi: i) presentan dormición primaria pronunciada, ii) requieren estratificación a bajas temperaturas (5°C) por un periodo de 30 días para disminuirla, iii) las temperaturas alternadas (ciclos diarios con 12 horas a cada temperatura de 15/25°C, o de 20/30°C) luego de la estratificación terminan la dormición, iv) la exposición a un pulso de luz roja no influye significativamente en la terminación de la dormición luego del período de estratificación mientras que un pulso de luz de rojo lejano inhibe su germinación, y v) que las GAs promueven la germinación de una parte de la población de estas semillas, aún de las que no han sido sometidas a estratificación (Çelik et al., 2006; Lawes & Anderson, 1980; Mattiuz et al., 1996; Windauer et al., 2016). El estudio en particular en esta especie que serviría como modelo, podría ser el punto de partida para avanzar en el conocimiento del proceso de dormición en otras especies frutales con comportamiento similar.

### 1.1.7. Modelo de “tiempo térmico de estratificación”

De acuerdo a lo expuesto, los mecanismos fisiológicos que actúan en la dormición de las semillas están regulados por factores endógenos (i.e. control hormonal y molecular) y exógenos (i.e. factores ambientales). La dormición es probablemente el aspecto más importante a tener en cuenta para la obtención de una planta en condiciones de campo o de vivero. Por lo tanto, para predecir el momento y la proporción de semillas que germinarán de un determinado lote, debemos considerar los cambios en el nivel de dormición en función del efecto de los factores ambientales que la modulan, y ese conocimiento debería permitir el desarrollo de herramientas que nos ayuden a optimizar el proceso. Es de esperar que, bajo distintas condiciones ambientales durante la estratificación de una población de semillas, fracciones de la misma tengan respuestas diferenciales en la germinación y en la sensibilidad a los factores terminadores de la dormición. Se han desarrollado modelos que permiten predecir la intensidad con la cual ocurre el proceso de salida de la dormición, dependiendo de las condiciones durante la estratificación (temperaturas y tiempos de estratificación). Así se logra soslayar la necesidad del conocimiento de los factores endógenos que intervienen en los mecanismos de la dormición, para poder intervenir o manejar los factores exógenos y obtener una respuesta en la dinámica de la germinación. Los modelos desarrollados generalmente son aplicados en cultivos extensivos y tienen como objetivo generar estrategias para el manejo de especies de “malezas”. Batlla & Benech-Arnold (2003) desarrollaron un modelo para semillas de *P. aviculare* utilizando el concepto de “tiempo térmico de estratificación”, el cual permite expresar con un tiempo térmico de estratificación común ( $S_{tt}$ ) resultados de diferentes combinaciones de temperaturas y tiempos de estratificación (por debajo de una temperatura base por encima de la cual la salida de la dormición no ocurre), encontrando que con similares sumas térmicas acumuladas durante la estratificación se obtienen respuestas similares en la germinación. Además, Batlla et al. (2003) observaron cambios en la sensibilidad de las semillas de la misma especie a los factores terminadores de la dormición (temperaturas alternadas) en la medida en que se modificó el tiempo térmico de estratificación. Basados en los resultados desarrollaron un modelo que permite predecir las respuestas a diferentes ciclos de temperaturas alternadas, en relación con la dinámica de la pérdida de la dormición de semillas con distintos tiempos térmicos de estratificación. Estos trabajos, extendidos para especies frutícolas como el kiwi (*Actinidia deliciosa*), manzano (*Malus domestica*), peral (*Pyrus communis*), duraznero (*Prunus persica*),

permitiría el diseño de estrategias de manejo de vivero que faciliten la propagación por semilla, en la medida en que se conozcan los parámetros que permiten caracterizar el nivel de dormición en cada especie, y se cuantifique el efecto de la temperatura y tiempo de estratificación sobre la tasa de cambio de esos parámetros.

## **1.2. Objetivos e Hipótesis**

### **1.2.1. Objetivo general**

Avanzar en el conocimiento de los aspectos fisiológicos de la dormición de semillas de *Actinidia deliciosa*.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

1. Investigar los mecanismos fisiológicos involucrados en la dormición de *Actinidia deliciosa* y su modulación por el ambiente, determinando:
  - 1.1. El efecto de la temperatura y el tiempo de estratificación sobre la tasa de salida de la dormición medida a través de cambios en el número de ciclos de temperaturas alternadas que permiten la germinación.
  - 1.2. La participación del ácido abscísico (ABA) y de las giberelinas en el proceso de imposición y salida de la dormición respectivamente.
  - 1.3. El grado de participación de las cubiertas en la dormición, involucradas en restricciones a la entrada de oxígeno a las semillas y/o a la salida de sustancias que imponen dormición e inhiben la germinación (ABA).
  
2. Generar una herramienta de simulación matemática para kiwi, fundamentada en el concepto de “tiempo térmico de estratificación”, que permita relacionar los cambios en los niveles de dormición con la temperatura y el tiempo de estratificación.

### 1.2.3. Hipótesis

El cumplimiento del Objetivo específico 1 se llevó a cabo a partir de la puesta a prueba de las siguientes hipótesis:

1. El tiempo y la temperatura de estratificación de las semillas de *A. deliciosa* determinan su nivel de dormición. Se predice que: con mayor tiempo y/o menor temperatura de estratificación (dentro de un rango determinado), las semillas tendrán un menor nivel de dormición. Un menor nivel de dormición determinará un aumento en la sensibilidad de las semillas a factores terminadores de la dormición, como las temperaturas alternadas.
2. En *A. deliciosa* las GAs y el ABA están involucradas en la atenuación y en la imposición de la dormición, respectivamente. Específicamente se predice que: i) semillas sin estratificar tienen una alta capacidad de sintetizar ABA que las mantiene en dormición y una baja sensibilidad al efecto promotor de las GAs; ii) semillas estratificadas pierden su capacidad de sintetizar ABA y/o aumentan la capacidad de catabolizar el ABA. Además, adquieren una alta sensibilidad al efecto promotor de las GAs y/o disminuye la sensibilidad al efecto inhibitor del ABA.
3. Las cubiertas de las semillas de *A. deliciosa* imponen dormición, a través de una restricción a la entrada de oxígeno al embrión y/o una restricción a la salida de sustancias que inhiben la germinación (e.g. ABA).

#### **1.2.4. Estructura de la tesis**

La presente tesis consta de 5 capítulos, el capítulo 1 presenta la introducción general que describe la problemática abordada, principalmente relacionada a la dormición de semillas y su relación con la especie objeto de estudio con la revisión bibliográfica correspondiente, además se plantean los objetivos e hipótesis del trabajo.

A continuación, se presentan los capítulos 2, 3 y 4:

2. Un modelo basado en el concepto de “tiempo térmico de estratificación”: una herramienta matemática para la eliminación de la dormición a escala de vivero.

3. Factores endógenos involucrados en la dormición: el papel del ácido abscísico y de las giberelinas.

4. La participación de las cubiertas de las semillas de kiwi en la disponibilidad de oxígeno para el embrión, y su relación con el contenido endógeno de ABA, la sensibilidad del embrión al ABA y el comportamiento germinativo de las semillas.

Los mismos derivan de los experimentos realizados y cada uno consta de una introducción, materiales y métodos, resultados y discusión.

Por último, el capítulo 5 es una discusión general con el marco conceptual de la problemática abordada, se contrastan las hipótesis planteadas en el capítulo 1, las contribuciones al avance del conocimiento con una discusión de los resultados más relevantes de manera integradora, y se plantean posibles líneas de investigación a futuro derivadas del presente trabajo.

## CAPITULO 2

Un modelo basado en el concepto de “tiempo térmico de estratificación”: una herramienta matemática para la eliminación de la dormición a escala de vivero.

## CAPITULO 2

2. Un modelo basado en el concepto de “tiempo térmico de estratificación”: una herramienta matemática para la eliminación de la dormición a escala de vivero.

## Resumen

La producción de plántulas de kiwi (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson) en el vivero generalmente se ve perjudicada debido a la baja germinación de las semillas por la presencia de dormición primaria. La dormición de las semillas hidratadas se alivia con la percepción de un período a bajas temperaturas (estratificación), pero además en esta especie la incubación bajo temperaturas alternadas (20/30°C) es requisito para la terminación de la dormición. El objetivo de este capítulo fue establecer relaciones funcionales entre los cambios en la sensibilidad de la población de semillas a diferentes ciclos de temperaturas alternadas y el alivio de la dormición, bajo diferentes tiempos y temperaturas de estratificación. Se propone un modelo basado en el concepto de “tiempo térmico de estratificación” para predecir cambios en la fracción de la población de semillas que germinaría en función del número de ciclos de temperaturas alternadas. Los resultados mostraron que la estratificación a temperaturas frías produce mayores tasas de cambio que la estratificación a temperaturas más cálidas. La construcción de curvas de respuesta con una escala de tiempo térmico fue posible porque las semillas que habían acumulado un tiempo térmico de estratificación similar lograron porcentajes de germinación similares en respuesta a ciclos de temperaturas alternadas. El modelo se validó con datos experimentales independientes que arrojaron una buena concordancia entre los datos predichos y observados. Esto constituye una herramienta importante para superar la dormición de una manera que debería resultar en una producción más eficiente, económica y rápida de plántulas o portainjertos de kiwi.

## 2.1. Introducción

En condiciones naturales en su sitio de origen, las semillas de *Actinidia deliciosa* cumplen los requerimientos para la salida de la dormición después de su dispersión al pasar por un período de bajas temperaturas y alta humedad en el suelo (otoño-invierno) (Batlla & Benech-Arnold, 2003; Baskin & Baskin, 1998), y posteriormente la llegada de la primavera otorga las condiciones ambientales conocidas como factores terminadores de la dormición (principalmente temperaturas alternadas) (Benech-Arnold & Sánchez, 1995).

La dormición puede ser definida como una condición interna de las semillas que impide su germinación bajo condiciones hídricas, térmicas y gaseosas que en otras circunstancias hubieran sido adecuadas para que la germinación tenga lugar (Bewley & Black, 1994; Benech-Arnold et al., 2000). Es conocido que dependiendo del momento en el que ocurre la dormición, la misma puede clasificarse en primaria y secundaria (Karssen, 1982). En este trabajo siempre se tratará sobre la primera (dormición primaria) por sus implicancias en la producción de plantas. La dormición primaria hace referencia a la condición en la que se encuentran las semillas apenas son dispersadas desde la planta madre (Bewley & Black, 1994).

La amplitud de condiciones ambientales que son permisivas para la germinación en una población de semillas está dada por su grado o nivel de dormición: en la medida que el nivel de dormición aumenta el rango de condiciones permisivo para la germinación disminuye o viceversa (Bouwmeester & Karssen, 1992; Vegis, 1964). La dormición relativa es aquella que se expresa a algunas temperaturas, pero no a otras; la dormición absoluta, en cambio, se expresa bajo cualquier condición (Hilhorst, 1995).

Batlla & Benech-Arnold (2003) desarrollaron para semillas de *Polygonum aviculare* un índice que permite independizar parámetros de las condiciones ambientales durante la estratificación (i.e. tiempo y temperatura) para llevarlas a una escala de tiempo común expresada en °Cd. La disminución en el nivel de dormición de una población de semillas está directamente asociado a esta acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ , por sus siglas en inglés, “stratification thermal time”). El tiempo térmico de estratificación contempla el tiempo que las semillas son estratificadas y su temperatura, ésta última por debajo de una “temperatura base”, temperatura umbral por encima de la cual la salida de la dormición no ocurre.

Las semillas de *A. deliciosa* necesitan de un período de estratificación para modificar su nivel de dormición y además tienen una fuerte respuesta a los factores terminadores de

la misma para eliminar las limitaciones finales para la germinación, una vez que la dormición se haya aliviado lo suficiente (Windauer et al., 2016).

Los objetivos del presente capítulo fueron establecer relaciones funcionales entre la sensibilidad de la población de semillas al estímulo de diferentes ciclos de temperaturas alternadas y salida de la dormición, debido a la estratificación a diferentes temperaturas. Sobre la base de estos resultados, se desarrolló un modelo de tiempo térmico de estratificación simple para predecir cambios en la fracción de la población de semillas que responde a diferente cantidad de ciclos de temperaturas alternadas en relación con la dinámica de la pérdida de dormición de las semillas. La cuantificación de estos cambios y la inclusión de la respuesta de las semillas de kiwi a estos factores ambientales en modelos de simulación, se puede utilizar como una herramienta para manejar esta restricción que impone la dormición de las semillas en la producción de plantas de *A. deliciosa* a escala de vivero.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Material vegetal**

Se utilizaron semillas de *Actinidia deliciosa* (cv. Bruno) extraídas de frutos cosechados en el monte frutal de la cátedra de fruticultura de la Universidad de Buenos Aires (34°35'S, 58°29'W). Las plantas macho polinizadoras fueron del cultivar Tomuri. Los frutos se cosecharon manualmente luego de alcanzar la madurez fisiológica con 11,5% de sólidos solubles totales (Harman, 1981). Inmediatamente después de la cosecha se procedió a la extracción de las semillas mediante trituración manual de los frutos.

El procedimiento completo para la extracción de las semillas fue el siguiente: los frutos se pelaron quitando la epidermis y la mayor cantidad de pulpa posible y se depositaron en recipientes de vidrio de 5 litros con agua durante 30 minutos para conseguir su ablandamiento. Posteriormente se trituraron manualmente hasta conseguir que todo el material llegue a una consistencia pastosa y se deposite en el fondo del recipiente, periódicamente se retiró el agua sobrenadante y se volvió a llenar con agua y triturar hasta lograr que la mayor cantidad de semillas vanas y residuos se pudieran retirar por flotación. Después de repetir el procedimiento varias veces se dejó decantar el material y se procedió a filtrarlo a través de coladores con diferente tamaño de malla hasta obtener sólo semillas libres de impurezas. Las semillas obtenidas se esterilizaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 10 minutos y luego se enjuagaron con abundante agua destilada para retirar el material desinfectante. Finalmente se procedió a su secado colocándolas sobre papel absorbente a temperatura ambiente por 48 horas, para luego ser almacenadas a 5°C en frascos esterilizados hasta el comienzo del experimento.

### **2.2.2. Condiciones generales y test de germinación**

Todos los tratamientos contaron con 3 repeticiones de 30 semillas cada una. Al inicio del experimento las semillas se contaron manualmente y fueron dispuestas en placas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de filtro Whatman No. 3 y 5 ml de agua destilada. Las placas se envolvieron en papel film para evitar la pérdida de humedad y en bolsas negras para evitar la exposición a la luz. Durante el periodo de incubación las semillas germinadas se contaron y retiraron diariamente, el criterio para contar una semilla como germinada fue cuando la radícula alcanzaba 1 mm de longitud.

### **2.2.3. Tratamientos**

Las semillas fueron estratificadas a 2°C, 5°C y 8°C durante 7, 11, 14, 18, 21 y 25 días; posteriormente fueron expuestas a 0, 3, 6 y 10 ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C, 12 horas cada una), luego de cada exposición se continuó con la incubación a 25°C constantes. El tratamiento de 0 ciclos corresponde a semillas incubadas a 25°C constantes durante 15 días.

#### 2.2.4. Análisis estadísticos

Para las figuras, análisis, desarrollo y validación del modelo se utilizó GraphPad Prism 4.0 (Motulsky, 2003).

#### 2.2.5. Desarrollo del modelo

Para lograr el desarrollo del modelo el objetivo fue establecer relaciones funcionales entre la sensibilidad de la población de semillas al estímulo de los diferentes ciclos de temperaturas alternadas y salida de la dormición, debido a la estratificación a diferentes temperaturas. Batlla y Benech-Arnold (2003) desarrollaron un modelo para semillas de *Polygonum aviculare* que permite predecir la fracción de la población de semillas que germinará a temperaturas de incubación constantes. Para cuantificar el efecto de los tiempos y temperaturas de estratificación variables sobre el estado de dormición de la población de semillas, los autores relacionaron los cambios en el nivel de dormición con la acumulación de unidades de tiempo térmico por debajo de una temperatura umbral para que ocurra la salida de la dormición, utilizando la siguiente ecuación:

$$S_{tt}(\text{°Cd}) = \text{Días}(d) * (T_b(\text{°C}) - T_c(\text{°C})) \quad \text{Ecuación (2.1)}$$

Donde:

$S_{tt}$  es el tiempo térmico de estratificación,  $T_b$  es la temperatura base de estratificación,  $T_c$  es la temperatura de estratificación y  $\text{Días}$  es la cantidad de días de estratificación.

En el presente modelo se utilizó el mismo índice ( $S_{tt}$ ) para cuantificar los efectos de la temperatura de estratificación sobre los cambios en la sensibilidad de la población de semillas a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas.

Para estimar la temperatura base de estratificación para las semillas de *A. deliciosa* se probaron diferentes “temperaturas base” hasta que se encontró el mejor ajuste para los tratamientos evaluados, realizando una prueba de menor variabilidad (Arnold, 1959).

De esta manera se analizaron los datos independizándolos de la temperatura y tiempo de estratificación y se obtuvieron las curvas de germinación correspondientes a cada suma

de tiempo térmico en función de los distintos ciclos de temperaturas alternadas analizados, de acuerdo al trabajo realizado por Batlla et al. (2003).

Las respuestas de germinación a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas de semillas que fueron estratificadas durante un número diferente de días a las tres temperaturas de estratificación mencionadas anteriormente ajustaron adecuadamente a la siguiente ecuación:

$$G_n = C * (1 - \exp(-K * N)) + G_0 \quad \text{Ecuación (2.2)}$$

Donde:

$G_n$  es el porcentaje de germinación obtenido con  $N$  ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C),  $C$  es la diferencia entre el porcentaje de germinación obtenido con 0 ciclos (incubación a 25°C constantes) y  $N$  ciclos,  $K$  es el efecto del número de ciclos ( $N$ ) en el porcentaje de germinación dado por la pendiente de la curva de dosis – respuesta,  $N$  es el número de ciclos de temperaturas alternadas y  $G_0$  es el porcentaje de germinación obtenido con 0 ciclos de temperaturas alternadas.

Para desarrollar el modelo, se ajustaron y agruparon las funciones que describen la respuesta de la germinación de las semillas a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas. Los datos de germinación, obtenidos en respuesta a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas para semillas que acumularon diferentes valores de  $S_{tt}$  bajo las tres temperaturas de estratificación, se promediaron y ajustaron usando una sola función. Esto derivó en una familia de curvas de respuesta, cada una determinada para diferentes valores de  $S_{tt}$  acumulados durante los diferentes tiempos de estratificación.

#### 2.2.6. Evaluación del modelo

Para evaluar el comportamiento del modelo con datos independientes se estratificaron cuatro repeticiones con 30 semillas cada una en placas Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo dos discos de filtro Whatman No. 3 y 5 ml de agua destilada a 2°C, 5°C y 8°C por 0, 14 y 25 días. Posteriormente las semillas fueron expuestas a 0 y 10 ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C, 12 horas cada una). Después de la exposición a 10 ciclos, las semillas se incubaron a 25°C constantes durante otros 15 días. El tratamiento de 0 ciclos correspondió a semillas incubadas a 25°C constantes durante 15 días inmediatamente después del final de la estratificación. Las semillas germinadas se contaron y registraron al final del período de incubación a temperatura constante, y los resultados se compararon con los datos arrojados por el modelo.

### 2.3. Resultados

#### 2.3.1. Efecto de la temperatura de estratificación sobre los cambios en la respuesta de germinación a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas

Las semillas sin estratificación no germinaron cuando se colocaron en condiciones favorables para la germinación a temperaturas de incubación constantes (25°C) o alternadas (20/30°C). Sin embargo, la prueba de tetrazolio mostró que estas semillas eran viables (datos no mostrados). Esto confirmó que la inhibición de la germinación estaba dada por la dormición primaria que tenían al ser extraídas de los frutos.

La respuesta de germinación a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C) varió con el tiempo de estratificación independientemente de la temperatura de estratificación (Fig. 2.1, 2.2 y 2.3) a excepción de aquellas semillas que fueron estratificadas menos de 11 días, las mismas mostraron porcentajes de germinación muy bajos (0 - 6%) (Fig. 2.1, a; 2.2, a y 2.3, a).

Cuando las semillas se estratificaron a 2°C, se observó una respuesta positiva a los ciclos de temperaturas alternadas en semillas estratificadas durante 11 días, alcanzando el 60% de germinación con 10 ciclos (Fig. 2.1, b). La sensibilidad a las temperaturas alternadas aumentó progresivamente para las semillas estratificadas durante 14 y 18 días (Fig. 2.1, c y d), las semillas estratificadas durante 18 días alcanzaron el 98% de germinación en respuesta a 10 ciclos de temperaturas alternadas. A medida que aumentó el tiempo de estratificación se incrementó la proporción de semillas que germinaron con temperaturas constantes alcanzando el máximo de 52% con el tiempo de estratificación máximo (Fig. 2.1, f); además se requirió una disminución progresiva en el número de ciclos a temperaturas alternadas para saturar la respuesta (Fig. 2.1; d, e y f); de hecho, sólo se requirieron 3 ciclos de temperaturas alternadas para alcanzar la máxima germinación después de 18 días de estratificación.

Cuando las semillas se estratificaron a 5°C (Fig. 2.2), las mismas respondieron de manera similar a las semillas estratificadas a 2°C, pero con una tasa de cambio más lenta en respuesta al estímulo de las temperaturas alternadas. Cuando las semillas se estratificaron durante 11 días, solo el 30% de las semillas germinaron con 10 ciclos de temperaturas alternadas (Fig. 2.2, b). A medida que avanzó el tiempo de estratificación, se observó una disminución progresiva en el número de ciclos requeridos para saturar la respuesta de germinación a los ciclos de temperaturas alternadas (Fig. 2.2, c - f) y la

proporción de semillas que germinaron incubadas a 25°C constantes aumentó (Fig. 2.2, f).

A la temperatura de estratificación más alta (8°C) las semillas mostraron porcentajes de germinación muy bajos después de 11 y 14 días de estratificación, incluso después de percibir el número máximo de ciclos de temperaturas alternadas (Fig. 2.3, b y c). Sólo después de los 18, 21 y 25 días de estratificación se obtuvo cierta germinación después de la incubación a temperaturas alternadas, aunque fue menor que la observada con las temperaturas de estratificación más bajas. La germinación máxima fue del 50% con 10 ciclos de temperaturas alternadas y estratificación de 25 días (Fig. 2.3, f). También se observó una disminución progresiva en el número de ciclos de temperaturas alternadas requeridos para saturar la respuesta de germinación. Sin embargo, fue mayor que el número de ciclos requeridos para saturar la respuesta con respecto a la estratificación a temperaturas más bajas (es decir, 6 ciclos después de la estratificación a 8°C versus 3 ciclos después de la estratificación a 2°C y 5°C).

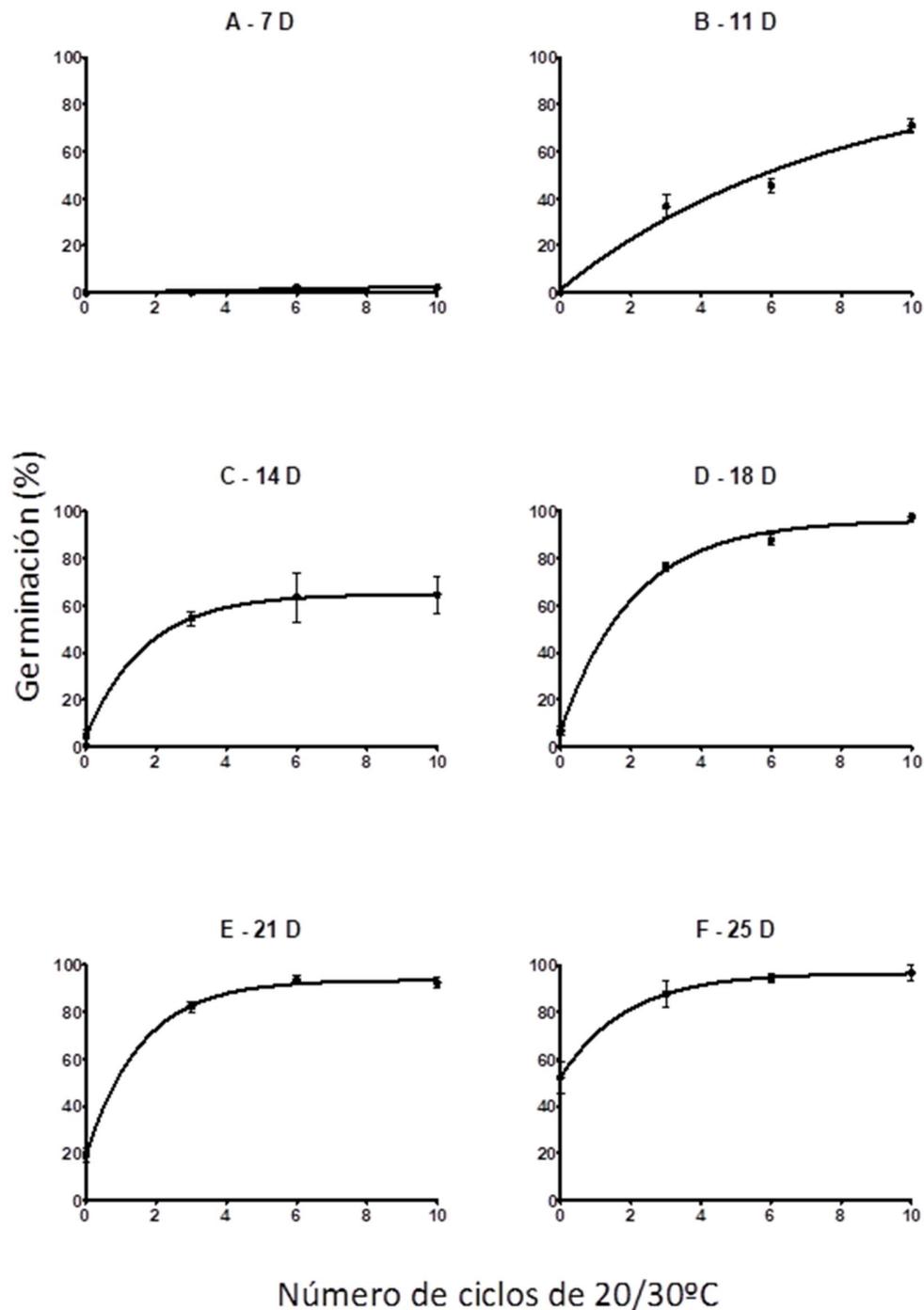


Figura 2.1 Porcentaje de germinación para semillas de *A. deliciosa* estratificadas a 2°C, durante diferentes periodos de tiempo (A) 7 d; (B) 11 d; (C) 14 d; (D) 18 d; (E) 21 d; (F) 25 d., en función de diferentes ciclos de temperaturas alternadas 20/30°C (0, 3, 6 y 10), e incubadas 15 días a temperaturas constantes de 25°C. Las curvas responden a la ecuación antes descrita  $G_n = C * (1 - \exp(-K * N)) + G_0$ . Las barras representan el error estándar.

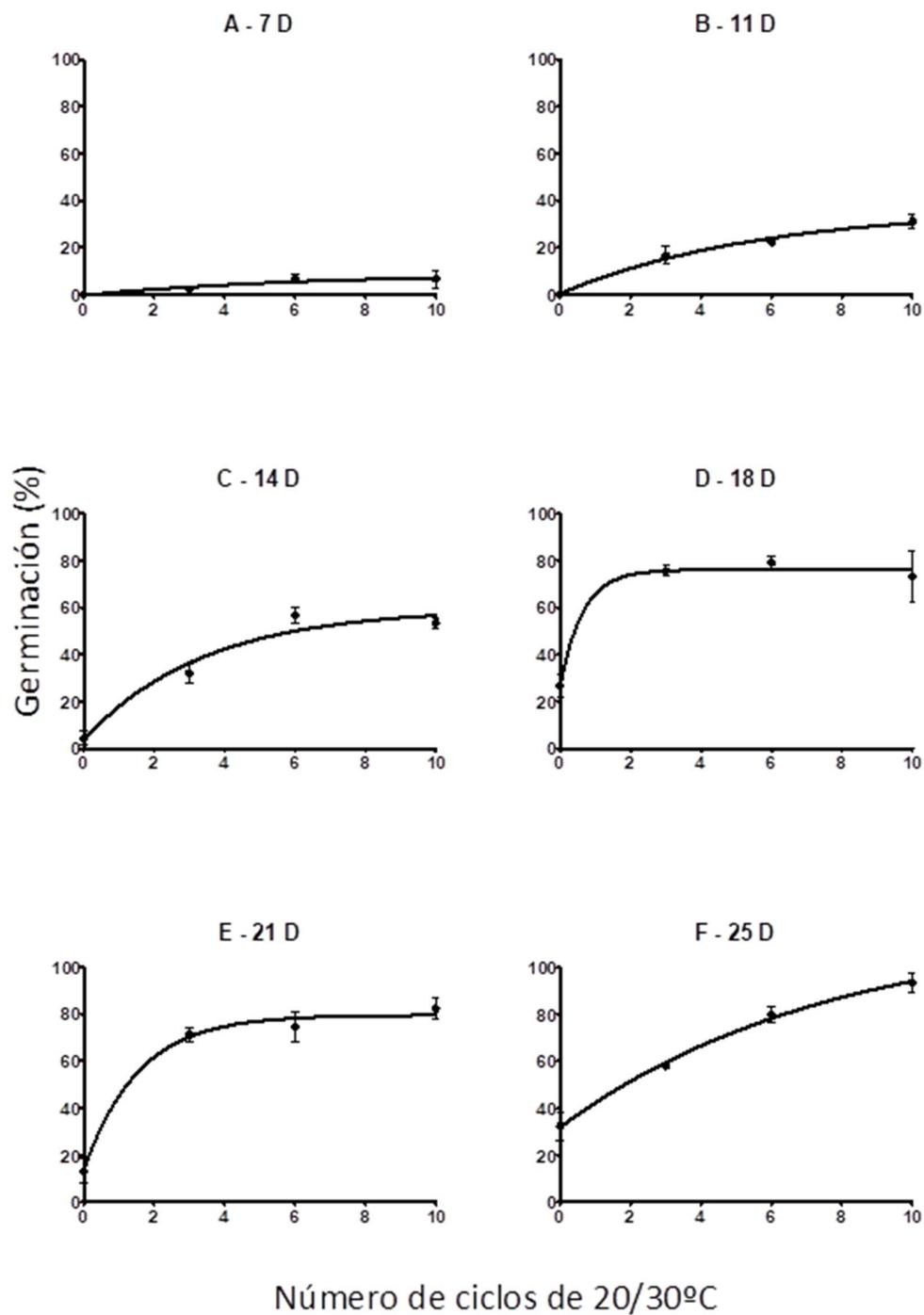


Figura 2.2 Porcentaje de germinación para semillas de *A. deliciosa* estratificadas a 5°C, durante diferentes periodos de tiempo (A) 7 d; (B) 11 d; (C) 14 d; (D) 18 d; (E) 21 d; (F) 25 d., en función de diferentes ciclos de temperaturas alternadas 20/30°C (0, 3, 6 y 10), e incubadas 15 días a temperaturas constantes de 25°C. Las curvas responden a la ecuación antes descripta  $G_n = C * (1 - \exp(-K * N)) + G_0$ . Las barras representan el error estándar.

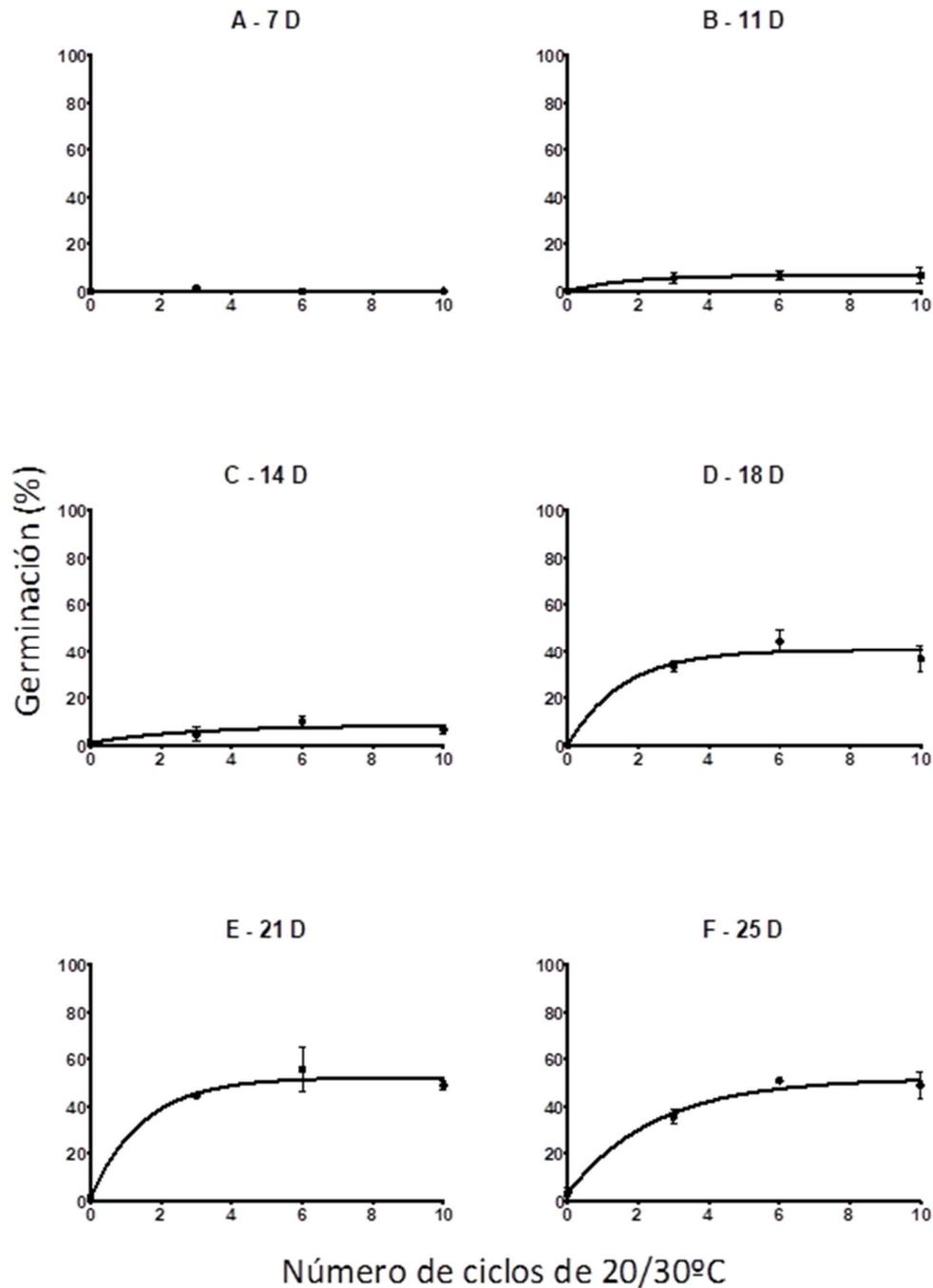


Figura 2.3 Porcentaje de germinación para semillas de *A. deliciosa* estratificadas a 8°C, durante diferentes periodos de tiempo (A) 7 d; (B) 11 d; (C) 14 d; (D) 18 d; (E) 21 d; (F) 25 d., en función de diferentes ciclos de temperaturas alternadas 20/30°C (0, 3, 6 y 10), e incubadas 15 días a temperaturas constantes de 25°C. Las curvas responden a la ecuación antes descrita  $G_n = C * (1 - \exp(-K * N)) + G_0$ . Las barras representan el error estándar.

### 2.3.2. Estimación de la temperatura base de estratificación de las semillas de *A. deliciosa*

Para estimar la temperatura base de estratificación, se ajustaron las curvas de respuesta de germinación de las semillas de *A. deliciosa* a la acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y se probaron diferentes temperaturas base hasta encontrar el mejor ajuste para los cuatro ciclos de temperaturas alternadas evaluados (0, 3, 6 y 10), realizando una prueba de menor variabilidad (Arnold, 1959). Se estimó que la temperatura base de estratificación de las semillas de *A. deliciosa* era de 14°C (Fig. 2.4).

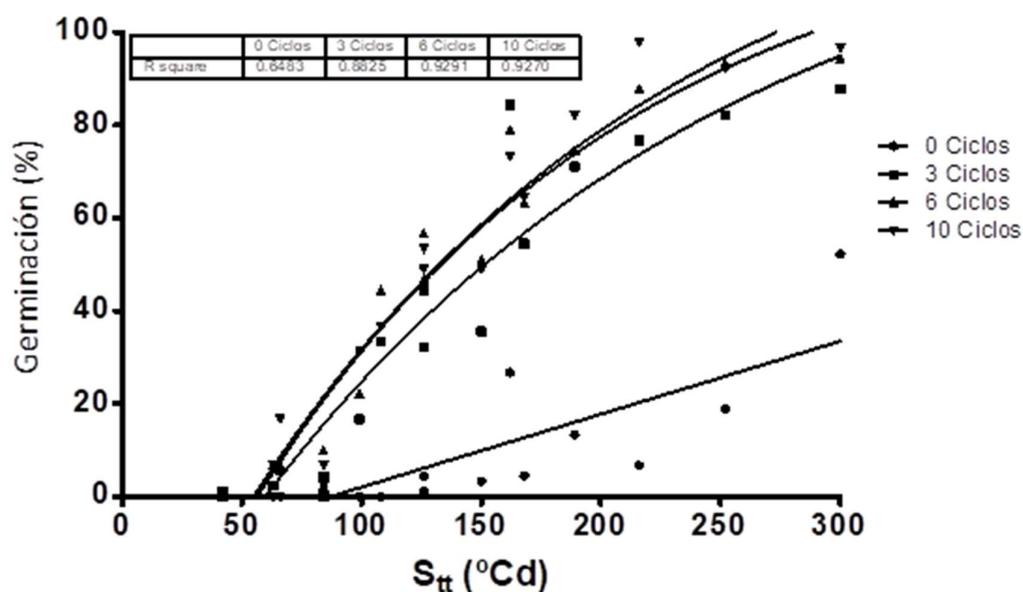


Figura 2.4 Curvas de respuesta de germinación de semillas de *A. deliciosa* en función del tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ , °Cd) determinadas para diferentes ciclos de temperaturas alternadas de incubación (0, 3, 6 y 10). Los datos utilizados para el ajuste de la curva correspondieron a porcentajes de germinación de semillas incubadas después de diferentes días de estratificación bajo 2, 5 y 8°C. Las curvas ajustan a la ecuación antes descrita  $G_n = C * (1 - \exp(-K * N)) + G_0$ . La tabla de la esquina superior izquierda muestra el R cuadrado de cada curva.

### 2.3.3. Desarrollo del modelo

Para el desarrollo del modelo se utilizó como punto de partida el modelo desarrollado por Batlla et al. (2003), para dar cuenta de los cambios progresivos observados en la fracción de la población de semillas que germinará en respuesta a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C), en función de la acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ).

Las curvas de respuesta se obtuvieron ajustando la respuesta de germinación para los diferentes ciclos de temperaturas alternadas evaluados (0, 3, 6 y 10) a la función exponencial anteriormente mencionada (ecuación 2.2). Se determinaron las curvas de respuesta para 74, 104, 126, 141, 165, 210, 252 y 300°Cd (Fig. 2.5).

Los datos utilizados para construir las curvas de respuesta, correspondientes a cada valor de  $S_{tt}$ , se describen en la Tabla 2.1. La construcción de las curvas de respuesta sobre una escala de tiempo térmico fue posible porque las semillas que acumularon similar tiempo térmico de estratificación alcanzaron porcentajes de germinación similares en respuesta a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas evaluados. Esto se indica claramente por el hecho de que las funciones ajustadas para diferentes valores de  $S_{tt}$  generalmente mostraron valores altos de  $R^2$  (Tabla 2.1).

Para predecir los cambios en la respuesta de germinación a los ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C) en relación al nivel de estado de dormición de la población de semillas, se relacionaron los parámetros C y K de cada curva obtenida con la acumulación de tiempo térmico de estratificación (Fig. 2.6).

Los cambios en C fueron descritos por las siguientes funciones bilineales:

$$C = -0,0335 + 0,0038 * S_{tt} \text{ (°Cd)} \text{ (Si } S_{tt} \leq 234,1) \quad \text{Ecuación (2.3)}$$

$$C = 2,3314 - 0,0063 * S_{tt} \text{ (°Cd)} \text{ (Si } S_{tt} > 234,1) \quad \text{Ecuación (2.4)}$$

mientras que los cambios en K fueron descritos por las siguientes funciones bilineales:

$$K = -0,022 + 0,0032 * S_{tt} \text{ (°Cd)} \text{ (Si } S_{tt} \leq 165) \quad \text{Ecuación (2.5)}$$

$$K = 0,4288 - 0,0004 * S_{tt} \text{ (°Cd)} \text{ (Si } S_{tt} > 165) \quad \text{Ecuación (2.6)}$$

Usando la ecuación (2.2), la relación obtenida entre C y K, y el  $S_{tt}$ , se pudo estimar la respuesta de germinación a un número determinado de ciclos de temperaturas alternadas de 20/30°C en relación a la acumulación de  $S_{tt}$  durante la estratificación de la semilla.

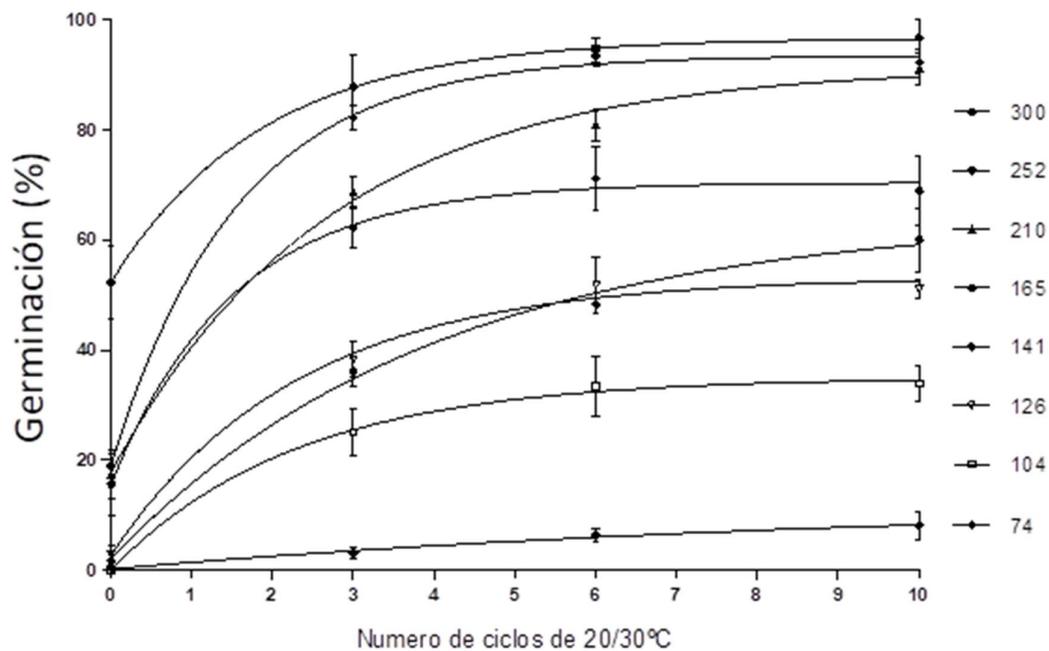


Figura 2.5 Curvas de respuesta de germinación de semillas de *A. deliciosa* a los ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C) determinadas para diferentes valores de tiempo térmico de estratificación ( $S_{it}$ , °Cd). Los datos utilizados para el ajuste de la curva correspondieron a porcentajes de germinación de semillas incubadas después de diferentes días de estratificación bajo 2°C, 5°C y 8°C que habían acumulado valores similares de  $S_{it}$ . Las curvas se ajustaron con la ecuación:  $G_n = C * (1 - \exp(-K * N)) + G_0$ . Las barras verticales indican el error estándar.

Tabla 2.1 Datos utilizados para los grupos de curvas de respuesta de *A. deliciosa* para los diferentes ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C) determinadas para diferentes valores de tiempo térmico de estratificación,  $S_{tt}$  (°Cd).

Datos utilizados para la determinación de grupos de curvas de respuesta				
Curva de respuesta, $S_{tt}$ (°Cd)	Temperatura de estratificación (°C)	Días de estratificación	$S_{tt}$ (°Cd)	$R^2$
74	5	7	63	0.2557
	8	11	66	
	2	7	84	
	8	14	84	
104	5	11	99	0.7248
	8	18	108	
126	5	14	126	0.8749
	8	21	126	
141	2	11	132	0.8911
	8	25	150	
165	5	18	162	0.7727
	2	14	168	
210	5	21	189	0.8941
	2	18	216	
	5	25	225	
252	2	21	252	0.9875
300	2	25	300	0.8697

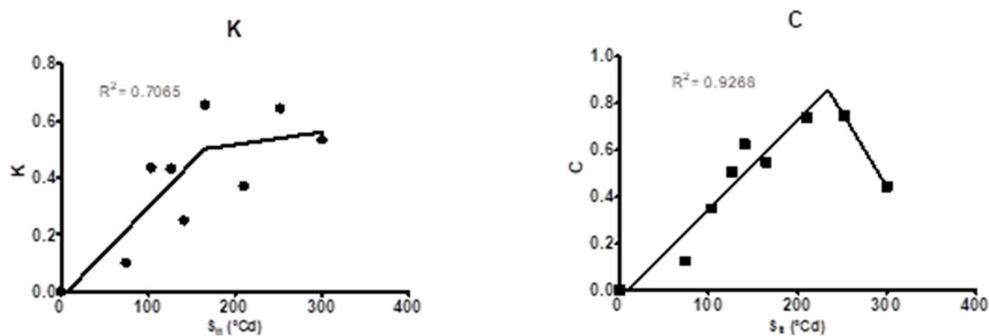


Figura 2.6 Dinámica de los coeficientes  $C$  y  $K$  en función del tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ). Los valores de  $C$  y  $K$  corresponden a los obtenidos en las curvas de respuesta a la germinación,  $G_n = C * (1 - \exp(-K * N)) + G_0$ , de semillas de *A. deliciosa* con diferentes ciclos de temperaturas alternadas (0, 3, 6 y 10), determinado para diferentes valores de  $S_{tt}$ . Las líneas continuas corresponden a las funciones bilineales:  $C = -0,0335 + 0,0038 * S_{tt}$  (°Cd) (si  $S_{tt} \leq 234,1$ );  $C = 2,3314 - 0,0063 * S_{tt}$  (°Cd) (si  $S_{tt} > 234,1$ );  $K = -0,022 + 0,0032 * S_{tt}$  (°Cd) (si  $S_{tt} \leq 165$ );  $K = 0,4288 - 0,0004 * S_{tt}$  (°Cd) (si  $S_{tt} > 165$ ).

### 2.3.4. Evaluación de la coherencia interna del modelo

Con el objetivo de determinar si el modelo desarrollado tenía una coherencia interna aceptable, todos los datos observados de respuesta de germinación fueron comparados con los datos arrojados por el modelo para las mismas condiciones. Se observó una alta coherencia interna representada por un  $R^2$  de 0,90 (Fig. 2.7).

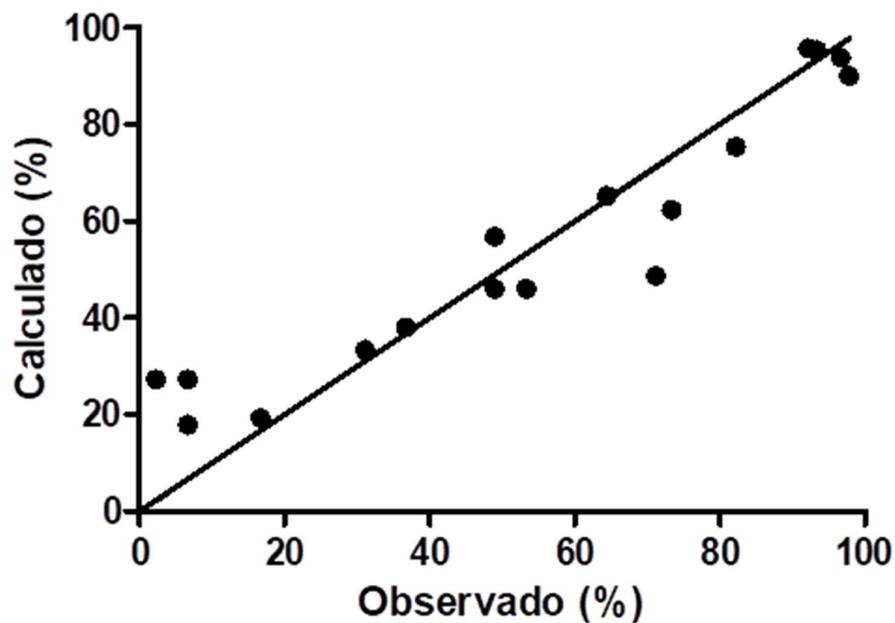


Figura 2.7 Relación entre los porcentajes de germinación observados y el porcentaje de germinación calculado mediante las ecuaciones (2.1-2.6), en respuesta a 10 ciclos de temperaturas alternadas. La línea continua representa una relación 1:1.

### 2.3.5. Evaluación del modelo con datos independientes

Para evaluar la performance del modelo los datos obtenidos con el mismo fueron comparados con datos independientes observados en otro experimento. Semillas estratificadas a 2°C, 5°C y 8°C durante 0, 14 y 28 días acumularon diferentes tiempos térmicos de estratificación: 0 (tres veces), 84, 126, 150, 168, 225 y 300 °Cd. La validación se llevó a cabo con datos de germinación obtenidos con semillas expuestas a 0 y 10 ciclos de temperaturas alternadas (20/30°C); por lo tanto, la evaluación del modelo se hizo con 18 puntos experimentales. El modelo presentó una performance muy razonable en su capacidad para predecir los cambios en los porcentajes de germinación en función del tiempo térmico de estratificación acumulado y los ciclos de temperaturas alternadas al que las semillas fueron expuestas (Fig. 2.8).

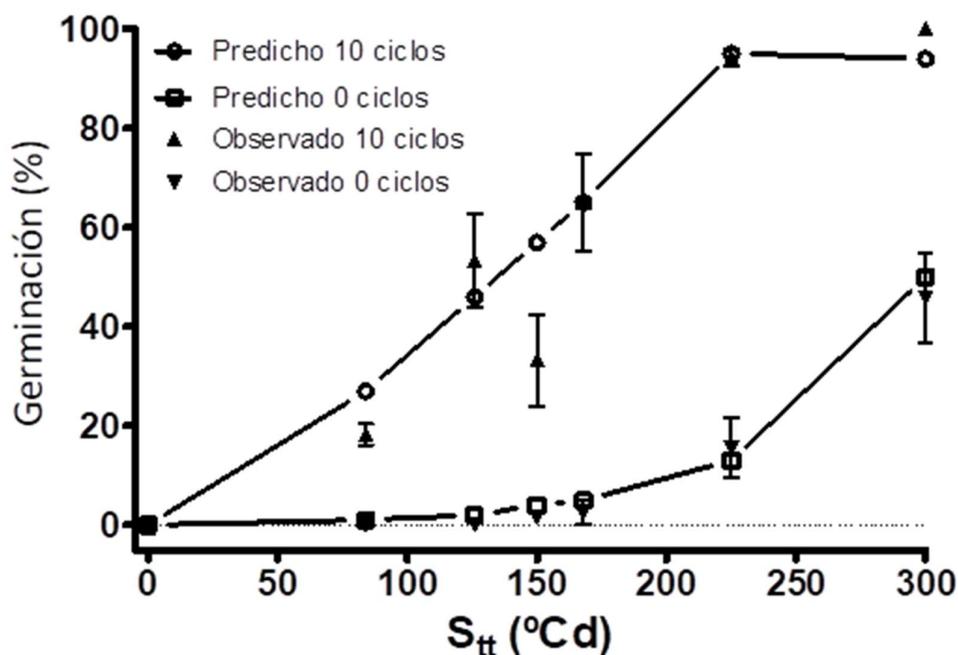


Figura 2.8 Curvas de respuesta de germinación de semillas de *A. deliciosa* en función del tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ , °Cd) determinadas para diferentes ciclos de temperaturas alternadas de incubación (0 y 10 días). Los datos utilizados para las curvas corresponden a valores predichos calculados con el modelo (símbolos abiertos), los símbolos cerrados corresponden a porcentajes de germinación de semillas incubadas durante 0, 14 y 25 días de estratificación bajo 2°C, 5°C y 8°C. Las barras verticales indican el desvío estándar.

#### 2.4. Discusión

Las semillas de kiwi sin estratificación no germinaron cuando se colocaron en condiciones favorables para la germinación a cualquiera de las temperaturas probadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la misma especie en estudios anteriores (Lawes & Anderson, 1980; Chin et al., 1992; Çelik et al., 2006; Windauer et al., 2016; González-Puelles et al., 2018). La ausencia de germinación puede atribuirse a la dormición primaria de la semilla establecida durante la maduración en la planta madre (Windauer et al., 2016) como ocurre en muchas otras especies (Hilhorst, 1995; Kucera et al., 2005; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Estudios previos en semillas de kiwi informaron sobre el requisito de estratificación y temperaturas alternadas para alcanzar porcentajes de germinación elevados (Lawes & Anderson, 1980; Windauer et al., 2016). Los resultados confirman que durante la estratificación a 2 o 5°C, las semillas ganaron gradualmente la capacidad de germinar en altos porcentajes, pero solo si estas semillas se incuban bajo temperaturas alternadas. Kim et al. (1987) indicaron que la temperatura óptima de incubación para *A. arguta* y *A. kolomikta* fue de 20°C y 25°C para *A. polygama*, lo que indica que las diferentes especies del género podrían presentar diferentes requisitos para la germinación.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, surgen alternativas para lograr una germinación alta y homogénea en semillas de kiwi una vez extraídas de la planta madre. El objetivo fue establecer relaciones funcionales entre los cambios en la sensibilidad de la población de semillas de kiwi a los estímulos de ciclos de temperaturas alternadas y la salida de la dormición a través del almacenamiento a bajas temperaturas y alta humedad (i.e. estratificación). Con este objetivo, un modelo matemático desarrollado por Batlla et al. (2003) fue utilizado como base para predecir cambios en la fracción de la población de semillas que germinarían en función del número de ciclos de temperaturas alternadas a medida que acumulan tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ). Este modelo adaptado constituye una herramienta importante para el diseño de procedimientos y técnicas de puesta en germinación para acelerar y economizar la producción de plántulas y plantas en vivero.

Los cambios en la sensibilidad a los ciclos de temperaturas alternadas durante la estratificación de las semillas se caracterizaron por una disminución en el número de ciclos requeridos para saturar la respuesta de germinación, y por una pérdida progresiva del requerimiento de temperaturas alternadas para la ruptura de la dormición en fracciones crecientes de la población de semillas. La tasa de estos cambios dependió de

la temperatura a la que se almacenaron las semillas para la estratificación: las temperaturas de estratificación bajas produjeron tasas de cambio más altas que las temperaturas de estratificación altas (Fig. 2.1, 2.2 y 2.3). Resultados similares a lo encontrado por Batlla et al. (2003) para *P. aviculare*.

El uso del  $S_{tt}$  para cuantificar el efecto de la temperatura de estratificación sobre los cambios en la sensibilidad de las semillas a los diferentes ciclos de temperaturas alternadas evaluados en este capítulo fue posible, porque las semillas estratificadas a diferentes temperaturas que habían acumulado similar  $S_{tt}$  mostraron curvas de respuesta similares (Tabla 2.1; Fig. 2.5). Este modelo dio una buena descripción de los cambios en términos de requisitos de temperaturas alternadas para la terminación de la dormición como una función de la acumulación de tiempo térmico de estratificación. Sin embargo, cuando se evaluó la coherencia interna, el modelo sobrestimó los datos obtenidos en las fases iniciales de la pérdida de dormición (cuando la germinación era inferior al 20%) (Fig. 2.7), siendo que en esta fase la germinación es pobre y errática. El proceso de modelado relaciona cambios en dos parámetros (C y K), lo que permite la construcción de curvas de respuesta a un número creciente de ciclos de temperaturas alternadas, con la acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) bajo una temperatura umbral para que se produzca la salida de la dormición (Fig. 2.6). La temperatura base para la salida de la dormición se estimó en 14°C (Fig. 2.4). Batlla y Benech-Arnold (2003) calcularon una temperatura base de 17°C para *P. aviculare*. Estas diferencias de temperatura base (entre otras razones) podrían atribuirse al diferente origen geográfico de estas especies y, posiblemente, al incipiente proceso de domesticación al que se ha sometido *A. deliciosa*, a diferencia de *P. aviculare* que es considerada como una especie maleza “rustica”.

Los resultados también mostraron que la acumulación de  $S_{tt}$  más alto (300°Cd, esto corresponde a semillas estratificadas a 2°C durante 25 días), no fue suficiente para producir una pérdida completa del requerimiento de temperaturas alternadas para la terminación de la dormición (Fig. 2.1, f). Sin embargo, resultados obtenidos en otros trabajos mostraron que, con períodos de estratificación mayores a 25 días, la germinación disminuye, probablemente debido a la inducción en dormición secundaria (Rodríguez, 2014). Por lo tanto, en kiwi, podríamos decir que el requisito de temperaturas alternadas para lograr una germinación alta y homogénea no se cancela incluso después de someter las semillas al tratamiento más eficaz para aliviar la dormición.

La adaptación del modelo desarrollado para semillas de *P. aviculare* a semillas de kiwi está dirigido a hacer más eficiente la producción de plántulas de kiwi en vivero. Mediante un simple cálculo se pueden obtener los ciclos de temperaturas alternadas necesarios para alcanzar la máxima germinación a partir de la acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación. Esto evitará pérdidas de tiempo innecesarias derivadas de ignorar la relación cuantitativa entre la temperatura de estratificación, el tiempo de estratificación y la cantidad de ciclos de temperaturas alternadas. La estratificación es una práctica común en horticultura, silvicultura y fruticultura, y varios autores reportaron diferentes combinaciones de tiempos y temperaturas de estratificación con resultados variables para diferentes especies de interés (Lawes & Anderson, 1980; Mattiuz et al., 1996; Çelik et al., 2006; González -Puelles et al., 2018). El concepto de “tiempo térmico de estratificación” aplicado al proceso de salida de la dormición, elimina la incertidumbre de “cuál es la mejor combinación” de temperatura y tiempo de estratificación y por lo tanto permite diseñar el mejor sistema de trabajo en condiciones de vivero para obtener altos porcentajes de germinación en el menor tiempo posible.

El modelo dio una buena descripción de los porcentajes de germinación de semillas expuestas a 0 y 10 ciclos de temperaturas alternadas en función del tiempo térmico de estratificación acumulado. Los datos observados coincidieron con las predicciones del modelo y solo se detectó una ligera sobreestimación (sólo cuando el tiempo térmico fue inferior a 150°Cd con 10 ciclos de temperaturas alternadas).

El modelo desarrollado en este capítulo podría hacer más eficiente y rápido el manejo para la producción de portainjertos en el vivero, y en consecuencia de plantas injertadas con la variedad. Como ejemplo, las semillas se pueden estratificar fácilmente en un refrigerador (i.e. 5°C) con un sustrato inerte durante 25 días y, de acuerdo con la ecuación (2.1), se calcula un tiempo térmico de estratificación de 225°Cd, con las ecuaciones restantes. (2.2-6) se determina que solo se necesitan 6 ciclos de temperaturas alternadas para lograr aproximadamente el 90% de germinación. Esta herramienta se puede utilizar tanto para viveros que cuenten con equipos de incubación de temperaturas alternadas o no, ya que también es posible saber cuánto tiempo antes hay que poner a estratificar las semillas antes de la llegada de la primavera, para luego utilizar la temperatura ambiente en el período en el que se alcanza suficiente alternancia de temperatura entre día y noche para la ruptura de la dormición.

## CAPITULO 3

Factores endógenos involucrados en la dormición: el papel del ácido abscísico y de las giberelinas.

## CAPITULO 3

3. Factores endógenos involucrados en la dormición: el papel del ácido abscísico y de las giberelinas.

## Resumen

La producción de plántulas de kiwi (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson) en el vivero se ve dificultada por la baja germinación de las semillas debido a la presencia de dormición primaria. La dormición de las semillas de kiwi es del tipo fisiológica y está regulada por numerosos factores endógenos principalmente hormonales. Las hormonas involucradas son el ácido abscísico y las giberelinas (imponiendo el estado de dormición y estimulando la germinación, respectivamente). Los objetivos del presente capítulo fueron evaluar el efecto promotor de las giberelinas en semillas con diferente nivel de dormición a diferentes temperaturas de incubación y, evaluar el efecto inhibitor del ácido abscísico y la sensibilidad de las semillas al mismo, en semillas con diferente nivel de dormición, distintas temperaturas de incubación, en semillas enteras y en semillas sin cubiertas. Otro de los objetivos fue determinar el contenido de ácido abscísico endógeno en semillas con diferente nivel de dormición e incubadas bajo temperatura constante y alternadas. Los resultados mostraron que la aplicación de giberelinas exógenas disminuyó el nivel de dormición. Además, se observó que el nivel de ácido abscísico endógeno en semillas con distinto nivel de dormición no fue significativamente diferente; y que la aplicación de ácido abscísico exógeno impone dormición, con cambios en la sensibilidad al mismo en semillas con distinto nivel de dormición.

### 3.1. Introducción

Es conocido que la dormición fisiológica está sujeta a control hormonal. Hormonas como las giberelinas (GAs) y el ácido abscísico (ABA) están involucradas (Ali-Rachedi et al., 2004; Jacobsen et al., 2002; Kucera et al., 2005) y no sólo a través de cambios en sus niveles endógenos, sino también a través de cambios en la sensibilidad al efecto de estos reguladores (Derkx & Karssen, 1993). Hay evidencia considerable de que el ácido abscísico (ABA) está involucrado en el establecimiento y mantenimiento de la dormición, determinando también la profundidad de la misma durante el desarrollo de las semillas (Bewley, 1997; Debeaujon & Koorneef, 2000; Grappin et al., 2000; Liu et al., 2010; Yoshioka et al., 1998). El ácido abscísico es un regulador positivo tanto en la inducción de la dormición durante la maduración de las semillas como en el mantenimiento de la dormición en semillas embebidas (Himmelbach et al., 2003; Bewley, 1997; Finkelstein et al., 2002). Durante el desarrollo de las semillas la acumulación de ABA es baja durante los estadios tempranos, aumenta durante el desarrollo y alcanza un máximo alrededor de madurez fisiológica, para luego caer, a veces hasta niveles indetectables (Bewley, 1997; Bewley & Black, 1994; Kermode, 2005). La salida de la dormición de las semillas se asocia con una reducción en el contenido de ABA (Millar et al., 2006), y/o la reducción de la sensibilidad del embrión al ABA (Bewley et al., 2013; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). La concentración de ABA en las semillas suele aumentar por síntesis *de novo* cuando las mismas son embebidas (Ali-Rachedi et al., 2004); sin embargo, esta capacidad se pierde (ya sea porque disminuye la capacidad de síntesis o porque aumenta la capacidad de catabolismo) en semillas que han salido de la dormición por almacenamiento en seco o por estratificación, dependiendo de la especie de que se trate (Bewley & Black, 1994). Entonces, el metabolismo del ABA está regulado a través de un balance entre su síntesis y catabolismo, siendo sintetizado indirectamente a partir de precursores de carotenoides (Nambara & Marion-Poll, 2003) e interviniendo en su catabolismo la enzima ABA 8'-hidroxilasa (Cutler et al., 2000). La señalización del ABA, en cambio, es mucho más compleja que su metabolismo y sus componentes no se han identificado en su totalidad (Finkelstein et al., 2008). Estudios recientes en *Arabidopsis* mostraron que existe un patrón diferencial de transcripción entre semillas con un alto y bajo nivel de dormición y que los eventos fisiológicos y moleculares asociados a los cambios en el nivel de dormición están principalmente correlacionados con la temperatura del suelo y la concentración y sensibilidad al ABA (Footitt et al., 2013, 2014; Footitt et al., 2011).

En cuanto a la acción de las giberelinas (GAs) hay evidencias de que cumplen un papel antagónico al del ABA, actuando como promotores de la germinación; sus niveles endógenos suelen aumentar en semillas en las que el nivel de dormición disminuye (Bewley, 1997; Bewley & Black, 1994). También hay evidencia de modificaciones en la sensibilidad del embrión al efecto promotor de la germinación que producen las GAs al cabo de algunas semanas de estratificación, como también de cambios en la capacidad de sintetizar GAs *de novo* durante la incubación a temperaturas que permiten la germinación como resultado del proceso de estratificación (Benech-Arnold, 2007). Hasta el momento los mecanismos moleculares involucrados en los niveles y señalización de las giberelinas son parcialmente conocidos. En *Actinidia deliciosa* se encontró que las GAs incrementan el porcentaje de germinación de las semillas; sin embargo, los resultados no coinciden en cuanto a la relación entre la concentración de las mismas y el aumento de la germinación (Çelik et al., 2006; Lawes & Anderson, 1980; Mattiuz et al., 1996). La exposición a GAs disminuye el tiempo de estratificación necesario para la germinación (Lawes & Anderson, 1980; Mattiuz et al., 1996) y podría en altas concentraciones lograr porcentajes de germinación elevados aún a temperaturas de incubación constantes (Çelik et al., 2006).

Además de lo expuesto, se observó que el balance entre ABA y GAs durante etapas tempranas del desarrollo es determinante en la duración de la dormición. Otros resultados demostraron que ambas hormonas actúan al mismo tiempo e incluso que el mantenimiento de la dormición requiere de una alta relación ABA/GAs, mientras que la terminación de la dormición requiere un incremento de la concentración de GAs y/o una disminución del ABA (Steinbach et al., 1997).

Cabe destacar que la participación de las hormonas mencionadas ha sido documentada sólo para algunas especies frutícolas de interés del género *Prunus* y *Malus* (Blake et al., 2000; Lewak, 2011). Si bien se ha avanzado mucho en el conocimiento de los cambios fisiológicos que ocurren durante la estratificación y los que ocurren en otros procesos de post-maduración, todavía es mucho lo que falta por conocer en especies frutales perennes.

Los objetivos del presente capítulo fueron:

1. Evaluar el efecto promotor de las giberelinas mediante la aplicación de diferentes concentraciones de giberelinas exógenas a semillas con diferente nivel de dormición e incubadas a temperaturas constante (25°C) y alternadas (20/30°C).
2. Evaluar el efecto inhibitor del ácido abscísico y la sensibilidad de las semillas al mismo mediante la aplicación de diferentes concentraciones de ABA exógeno en semillas con distinto nivel de dormición, incubadas a temperaturas constante y alternadas en semillas con y sin cubiertas.
3. Evaluar el contenido de ácido abscísico endógeno en semillas, y su relación con diferentes niveles de dormición y diferentes temperaturas de incubación (constante y alternadas).

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Condiciones generales**

Todos los tratamientos de los tres experimentos del presente capítulo contaron con 3 repeticiones de 30 semillas cada una. Al inicio del experimento las semillas se contaron manualmente y fueron dispuestas en placas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de filtro Whatman No. 3 y 5 ml de agua destilada. Las placas eran envueltas en papel film para evitar la pérdida de humedad y en bolsas negras para evitar la exposición a la luz, la temperatura de estratificación de todos los experimentos fue de 5°C. Se detallará posteriormente en “tratamientos” las particularidades de cada experimento.

### **3.2.2. Test de germinación**

Durante los periodos de incubación las semillas germinadas se contaron y retiraron diariamente, el criterio para contar una semilla como germinada era cuando la radícula alcanzaba 1 mm de longitud. Se detallará posteriormente en “tratamientos” las particularidades de cada experimento.

### **3.2.3. Tratamientos**

#### **3.2.3.1. Determinación de la respuesta a giberelinas exógenas**

Para determinar el efecto de giberelinas exógenas sobre la germinación, semillas estratificadas durante 0, 14 y 28 días, fueron incubadas a temperatura constante (25°C) y temperaturas alternadas (20/30°C), en agua destilada (tratamiento control) y soluciones de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>, PhytoTechnology Laboratories) en concentraciones de 10, 50, 100, 500 y 1000 mg/l.

#### **3.2.3.2. Determinación del ácido abscísico endógeno**

Para la determinación del contenido de ácido abscísico endógeno semillas estratificadas durante 0 y 28 días con el fin de tener respuestas vinculadas a alto y bajo nivel de dormición (respectivamente), se incubaron a temperatura constante (25°C) y a temperaturas alternadas (20/30°C). Para la determinación del contenido de ABA, se tomaron muestras de semillas de cada tratamiento en diferentes tiempos durante la incubación: 0 (sin incubar), 24, 120 y 168 horas antes de la germinación de la primera semilla, estas muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido, y almacenadas a -80°C hasta ser liofilizadas. Luego cada muestra liofilizada fue molida en un mortero, pesada y almacenada a -20°C hasta realizarse la determinación del contenido de ABA.

Para la determinación de ABA endógeno, a cada muestra se le agregó agua destilada (100:1 v/p) y se la dejó durante toda la noche sobre un agitador a 4°C. Después cada muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 4 min y se analizaron 50 µl del sobrenadante por muestra in duplo con un radioinmunoensayo como se describe en Steinbach et al. (1995) usando un anticuerpo mono-clonal AFR MAC 252 (Quarrie et al., 1988), y ABA tritiado (Amersham Biosciences, Reino Unido).

Paralelamente, en semillas estratificadas durante 0 y 28 días e incubadas a temperatura constante (25°C) y temperaturas alternadas (20/30°C), se hicieron las pruebas de germinación correspondientes para obtener los porcentajes de germinación vinculados a cada contenido endógeno de ABA.

### **3.2.3.3. Determinación de la respuesta al ácido abscísico exógeno en semillas con y sin cubiertas.**

Semillas estratificadas durante 0, 14 y 28 días fueron incubadas a temperatura constante (25°C) y temperaturas alternadas (20/30°C) en agua destilada (solución control) y con distintas dosis de soluciones de ABA (Sigma-Aldrich, Estados Unidos): 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 25; 50 y 100 µM. Estos tratamientos se realizaron tanto en semillas enteras como en semillas a las que se le sacaron las cubiertas antes de la incubación. Para la remoción de las cubiertas de las semillas se utilizó una Lupa binocular Marca Nikon (Nikon SMZ 10; Nikon, Tokio, Japón). Las cubiertas se removieron mediante pinza y bisturí y las semillas cuya integridad se veía afectada eran descartadas.

### **3.2.4. Análisis estadísticos**

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

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Efecto de las giberelinas (GA<sub>3</sub>)

##### Efecto de los tiempos de estratificación

Los resultados mostraron que ante el agregado de diferentes dosis de giberelinas (GAs/GA<sub>3</sub>) las semillas sin estratificar (i.e. dormidas) no presentaron germinación tanto bajo la incubación con temperaturas alternadas (20/30°C) como con temperaturas constantes (25°C); sólo con concentraciones mayores a 500 mg/l de GA<sub>3</sub> presentaron porcentajes muy bajos de germinación (aproximadamente un 10%), (Fig. 3.1, a y b).

Con 14 días de estratificación e incubación bajo temperaturas alternadas, las semillas adquirieron mayor sensibilidad a las dosis crecientes de GA<sub>3</sub> pasando de porcentajes de germinación menores al 10% en agua destilada hasta alcanzar un máximo de aproximadamente 65% a partir de una concentración de 500 mg/l de GA<sub>3</sub> (Fig. 3.1, c).

Para la misma cantidad de días de estratificación (i.e. 14) pero incubadas a temperaturas constantes se observó una respuesta similar con la diferencia de que a partir de 50 mg/l de GA<sub>3</sub> hubo germinación detectable (aproximadamente 20%), y el máximo porcentaje (50%) se alcanzó con la concentración de 1000 mg/l de GA<sub>3</sub> (Fig. 3.1, d).

Cuando las semillas fueron estratificadas 28 días (i.e. bajo nivel de dormición) e incubadas bajo temperaturas alternadas la respuesta al agregado de GA<sub>3</sub> desapareció parcialmente alcanzándose porcentajes de germinación mayores al 60% tanto en agua como en la mayoría de las dosis utilizadas (e.g. 0 mg/l vs. 1000 mg /l), (Fig. 3.1, e), con tendencia a un leve aumento de la germinación con dosis mayores a 100 mg/l, aunque sin presentar diferencias significativas con las semillas incubadas en agua destilada (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ). En la misma cantidad de tiempo de estratificación (28 días) pero bajo incubación con temperaturas constantes se observó un aumento en la germinación con dosis crecientes de GA<sub>3</sub> pasando de un 10% aproximado de germinación en agua destilada hasta alcanzar un máximo de 50% con la máxima dosis de GA<sub>3</sub> aplicada (Fig. 3.1, f).

Los resultados mostraron que con estratificaciones de 14 y 28 días el porcentaje de germinación aumentó tanto en las semillas incubadas en agua como en las incubadas con dosis crecientes de GA<sub>3</sub>, mientras que la germinación siempre fue mayor en semillas con 28 días de estratificación respecto a 14 días, independientemente de la dosis de GA<sub>3</sub> exógena aplicada, con excepción de la dosis de 1000 mg/l en la que no se encontraron diferencias significativas (Fig. 3.1) (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ).

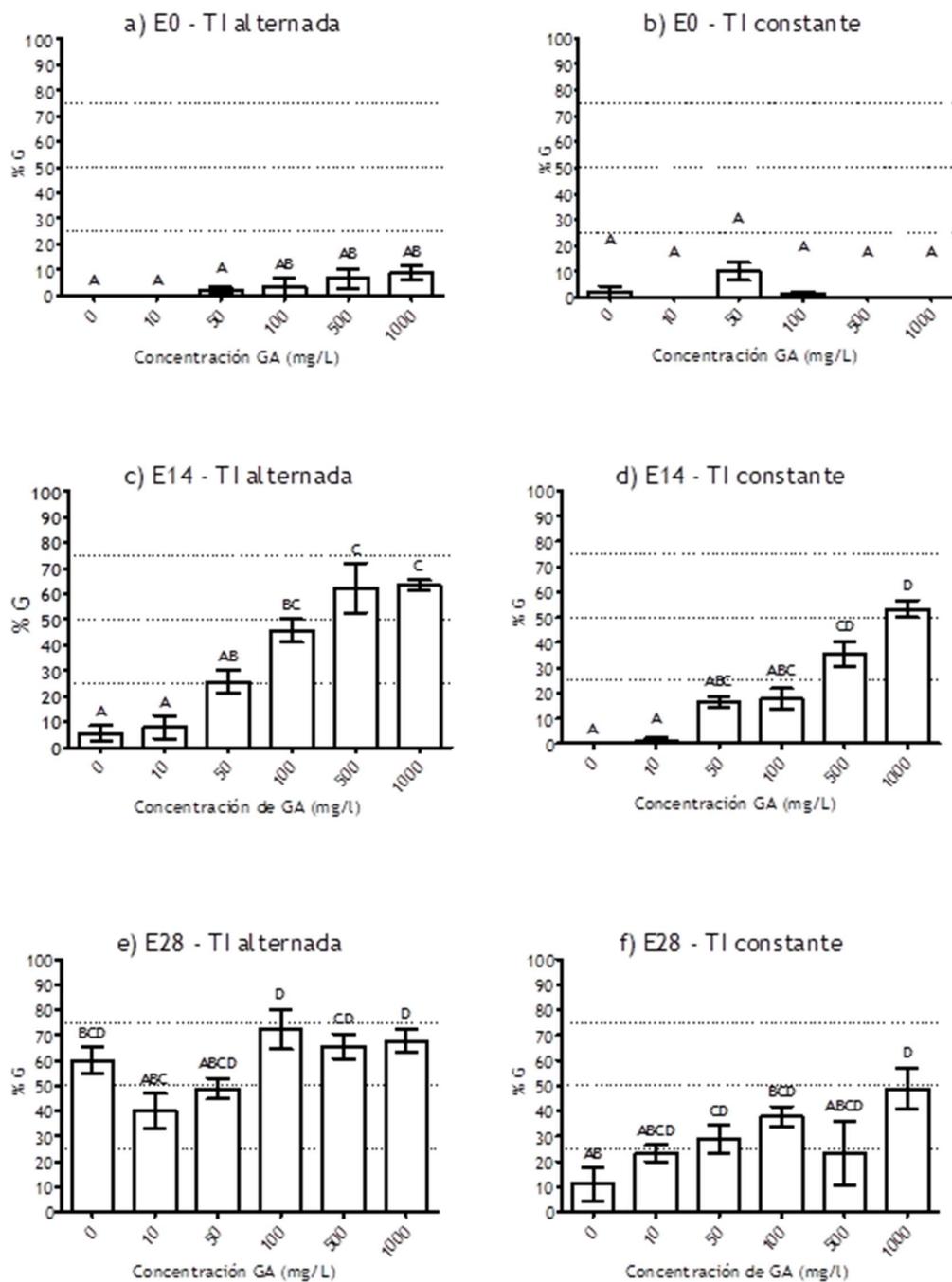


Figura 3.1. Porcentaje de germinación de las semillas en función de la concentración de giberelinas ( $GA_3$ ) para: a, c y e: semillas incubadas bajo temperaturas alternadas ( $20/30^{\circ}C$ ), y b, d y f: semillas incubadas bajo temperatura constante ( $25^{\circ}C$ ); las semillas tuvieron tres tiempos de estratificación: a y b: 0 días, c y d: 14 días y, e y f: 28 días. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas y letras diferentes significan diferencias significativas entre medias (Test de Tukey  $P \leq 0,05$ ).

**Efecto de la temperatura de incubación**

Semillas incubadas a temperaturas alternadas tuvieron mayor porcentaje de germinación que semillas incubadas a temperatura constante (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ) independientemente del tiempo de estratificación y la dosis de giberelinas, con excepción del tratamiento de 1000 mg/l en el que no se encontraron diferencias significativas entre temperaturas de incubación (Fig. 3.1).

### 3.3.2. Efecto del ácido abscísico

#### 3.3.2.1. Ácido abscísico endógeno

Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ) en la concentración de ácido abscísico endógeno (pg ABA/mg peso seco de semilla) en semillas dormidas (sin estratificación) y semillas despiertas (28 días de estratificación), tanto bajo la incubación con temperaturas alternadas (20/30°C) como con temperaturas constantes (25°C), en los 4 tiempos en los que se realizó la medición durante la incubación (0, 24, 120 y 168 h), (Fig. 3.2). Sin embargo, la germinación de las semillas control evaluadas en paralelo a los tratamientos de medición de ABA endógeno fue casi nula excepto en el tratamiento de 28 días de estratificación bajo incubación con temperaturas alternadas (20/30°C), (Fig. 3.3).

Semillas estratificadas 28 días e incubadas bajo temperaturas alternadas (20/30°C) tuvieron una germinación de aproximadamente 80% (Fig. 3.3). En este caso el contenido de ABA endógeno fue de aproximadamente 170 pg ABA/mg peso seco de semilla en la hora 0 de la incubación (i.e. sin incubar, terminada la estratificación), para luego descender a aproximadamente 100 pg al cabo de 24 horas y mantenerse relativamente constante a las 120 y 168 horas (inicio de la germinación) (Fig. 3.2, a). Cuando las semillas fueron estratificadas 28 días e incubadas a temperatura constante (25°C) (Fig. 3.3), la germinación fue prácticamente nula. Sin embargo, el comportamiento del ABA endógeno fue muy similar al caso anterior con la diferencia de que el descenso a las 24 horas fue levemente mayor cayendo a aproximadamente 80 pg ABA/mg peso seco para luego mantenerse constante (Fig. 3.2, b). Las semillas sin estratificar e incubadas a temperaturas alternadas no germinaron (Fig. 3.3), y el contenido de ABA endógeno y su evolución fue prácticamente igual al tratamiento de 28 días de estratificación bajo incubación con temperaturas alternadas (Fig. 3.2, c). Por último, las semillas sin estratificar e incubadas bajo temperatura constante no germinaron (Fig. 3.3), y a diferencia de lo que sucedió con los tratamientos descritos anteriormente, el contenido de ABA endógeno inicial (i.e. antes de la incubación) fue de aproximadamente 100 pg ABA/mg peso seco, para luego mantenerse constante hasta la hora 168 (Fig. 3.2, d).

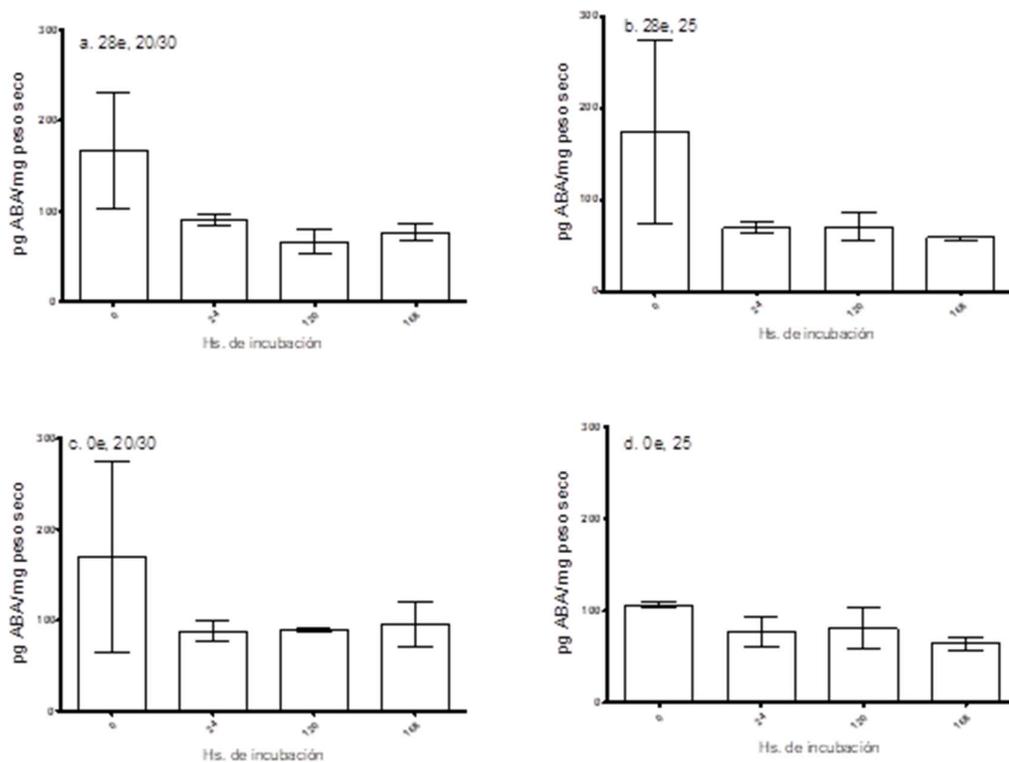


Figura 3.2. Contenido de ABA endógeno (pg de ácido abscísico por mg de peso seco de semilla) durante la incubación de semillas: a con 28 días de estratificación e incubación a 20/30°C, b. con 28 días de estratificación e incubación a 25°C, c. 0 días de estratificación e incubación a 20/30°C, d. 0 días de estratificación e incubación a 25°C; medidos a las 0, 24, 120 y 168 horas de incubación. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas.

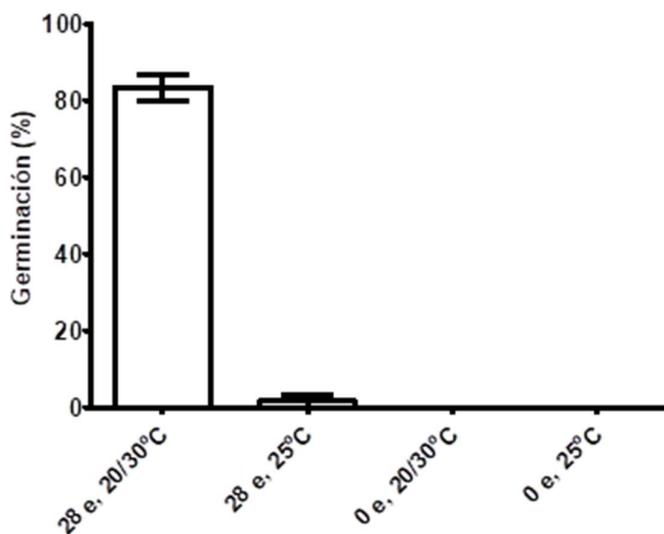


Figura 3.3. Porcentaje de germinación para semillas estratificadas 28 días (28 e) y 0 días (0 e), bajo incubación con temperatura constante (25°C) y temperaturas alternadas (20/30°C). Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas.

### 3.3.2.2. Efecto y sensibilidad al ácido abscísico en semillas con y sin cubiertas

Cuando las semillas se incubaron bajo temperaturas constantes la germinación fue pobre y errática independientemente de la dosis de ABA en las que fueron incubadas (resultados no mostrados). Por ende, los resultados que se detallan a continuación fueron obtenidos mediante la incubación de semillas bajo temperaturas alternadas (20/30 °C).

Los resultados mostraron que en todos los tratamientos la germinación disminuyó en la medida que aumentó la concentración de ABA, excepto en semillas sin estratificar e incubadas con cubiertas dado que no germinaron bajo ninguna de las concentraciones de ABA utilizadas; además en todos los tratamientos la germinación de las semillas fue inhibida totalmente con la dosis de 12,5  $\mu\text{M}$  de ABA (Fig. 3.4, a y b).

#### **Semillas incubadas con cubiertas**

Cuando las semillas fueron estratificadas 14 y 28 días e incubadas con cubiertas en agua destilada (i.e. ABA 0  $\mu\text{M}$ ) se lograron los máximos porcentajes de germinación alcanzados en el experimento (cerca al 100%). Semillas estratificadas 14 días e incubadas con la dosis de 2,5  $\mu\text{M}$  de ABA tuvieron una germinación similar con respecto a las incubadas en agua destilada (0  $\mu\text{M}$  de ABA), y a partir de la incubación con dosis de 5  $\mu\text{M}$  la germinación comenzó a disminuir alrededor de un 20% en la medida que aumentaba la concentración de ABA hasta ser inhibida completamente con 12,5  $\mu\text{M}$  de ABA. En el tratamiento de semillas estratificadas 28 días hubo una respuesta similar en cuanto a la tendencia descendente. Sin embargo, la germinación se mantuvo elevada hasta cuando las mismas fueron incubadas con 5  $\mu\text{M}$  de ABA, y a partir de la incubación con 7,5  $\mu\text{M}$  de ABA la germinación disminuyó a niveles cercanos al 50%, y fue totalmente inhibida con dosis superiores (Fig. 3.4, a).

### **Semillas incubadas sin cubiertas**

Cuando las semillas fueron incubadas sin cubiertas y sin estratificar en agua y con la dosis de 2,5  $\mu\text{M}$  de ABA, alcanzaron similares porcentajes de germinación (45 y 40%, respectivamente). Con las dosis de 5  $\mu\text{M}$  de ABA la germinación descendió a aproximadamente 20% y solo germinó el 10% con la dosis de 7,5  $\mu\text{M}$ . A partir de esta dosis no hubo germinación detectable (con 10 y 12,5  $\mu\text{M}$  de ABA).

Las semillas incubadas sin cubiertas y estratificadas 14 días germinaron aproximadamente un 50% tanto bajo la incubación en agua destilada como con las dosis de 2,5 y 5  $\mu\text{M}$  de ABA, mientras que con dosis de 7,5 y 10  $\mu\text{M}$  de ABA la germinación descendió a 30 y 10%, respectivamente, y fue nula al incubarlas con 12,5  $\mu\text{M}$ .

Las semillas incubadas sin cubiertas con 28 días de estratificación mostraron una germinación elevada cuando se las incubo en agua destilada y con 2,5  $\mu\text{M}$  de ABA (aproximadamente 90%), disminuyo a 60% al incubarlas con 5  $\mu\text{M}$  de ABA, y cuando se las incubaron con concentraciones de 7,5 y 10  $\mu\text{M}$  ABA la germinación fue cercana al 30%, mientras que no hubo germinación cuando la concentración en la incubación fue de 12,5  $\mu\text{M}$  de ABA (Fig. 3.4, b).

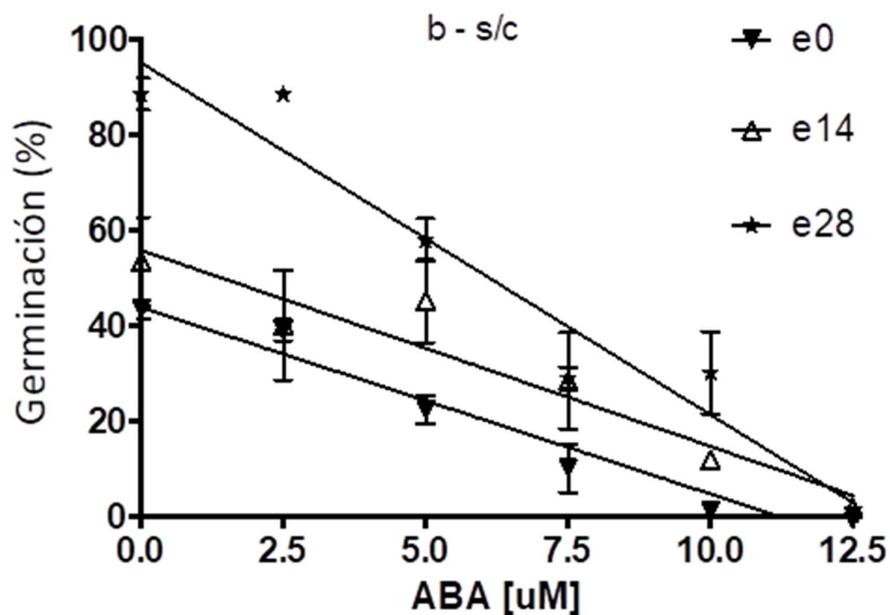
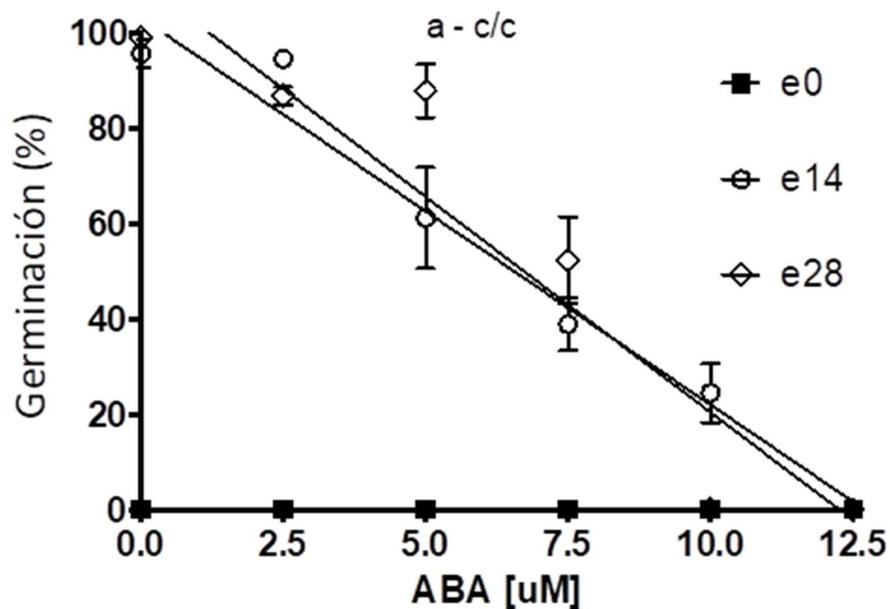


Figura 3.4. Porcentaje de germinación en función de la concentración de ABA exógeno aplicado en semillas estratificadas 28 días (e28), 14 días (e14) y 0 días (e0), bajo incubación con temperaturas alternadas (20/30°C); para a: semillas con cubiertas y b: semillas sin cubiertas. Las líneas llenas se ajustaron mediante ecuaciones lineales para cada tiempo de estratificación. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas.

### 3.4. Discusión

En el presente capítulo se evaluó el efecto promotor de la germinación de las giberelinas exógenas, y el efecto promotor de la dormición del ácido abscísico exógeno. Además, se midió el contenido de ácido abscísico endógeno en semillas con diferente nivel de dormición. Los resultados mostraron que las giberelinas exógenas promueven parcialmente la germinación (Fig. 3.1); también se observó que el contenido de ácido abscísico endógeno en semillas con diferente nivel de dormición no es significativamente diferente (Figs. 3.2 y 3.3). Por último, los resultados mostraron que la aplicación de ácido abscísico exógeno impone dormición, con cambios en la sensibilidad al mismo en semillas con diferente nivel de dormición (Fig. 3.4).

En cuanto al papel de las giberelinas diferentes autores reportaron resultados similares a los encontrados en el presente capítulo (Çelik et al., 2006; Lawes & Anderson, 1980; Mattiuz et al., 1996; Windauer et al., 2016). La aplicación exógena de GAs no fue suficiente para promover la germinación cuando las semillas estaban con altos niveles de dormición (i.e. sin estratificar) (Fig. 3.1, a y b). Sin embargo, aumentó significativamente la sensibilidad a las mismas cuando la dormición de las semillas estaba parcialmente aliviada (i.e. con 14 días de estratificación) (Fig. 3.1, c y d). Además, se observó que las GAs exógenas reemplazaron parcialmente a las temperaturas alternadas como factor terminador de la dormición durante la incubación (Fig. 3.1, d y f). Los resultados mostraron que el porcentaje de germinación en general fue mayor en semillas incubadas con temperaturas alternadas. La dormición está mediada principalmente por un balance hormonal entre las GAs y el ABA (Finkelstein et al., 2008). Está ampliamente documentado que el ABA y las GAs cumplen un papel antagonico en la dormición y en el control de la germinación en especies que poseen dormición fisiológica (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Es decir, se puede inferir que la aplicación de GAs no fue suficiente para contrarrestar el efecto inhibitorio del ABA sobre la germinación.

En cuanto al efecto del ácido abscísico, en este capítulo se midió la evolución del contenido endógeno del mismo durante la incubación y hasta el inicio de la germinación, en semillas con diferente nivel de dormición, con temperatura de incubación constante (25°C) y temperaturas de incubación alternadas (20/30°C). También se evaluó el efecto promotor del ABA sobre la dormición, mediante su aplicación exógena en semillas con diferentes niveles de dormición, con y sin sus cubiertas en la incubación.

Cuando se midió el contenido de ABA endógeno en semillas despiertas y dormidas (i.e. estratificadas 28 días y sin estratificar, respectivamente), incubadas a temperatura constante y alternadas, no se detectaron diferencias significativas en el mismo (test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ) (Fig. 3.2). Aunque no hubo diferencias significativas, se observó un descenso de la concentración de ABA endógeno desde el inicio de la incubación hasta las 24 horas de la misma, en donde se estabiliza para ser similar hasta las 168 horas (i.e. cuando comienza la germinación). Esto sucedió en las cuatro condiciones evaluadas (Fig. 3.2). Sin embargo, esta tendencia es menos marcada cuando las semillas no fueron estratificadas y se incubaron a temperaturas constantes (Fig. 3.2, d). Estos resultados mostraron que el contenido de ABA endógeno de las semillas no cambió con la temperatura de incubación, y tampoco mostró relación con el nivel de dormición.

Los resultados coinciden con lo reportado por Dominguez et al. (2016) en girasol (*Helianthus annuus*), una especie cuyas semillas también presentan dormición fisiológica. En este trabajo aquenios incubados a diferentes temperaturas (12 y 30°C) no mostraron diferencias significativas en el contenido de ABA endógeno, y tampoco hubo una relación del mismo con el nivel de expresión de la dormición.

Por otro lado, los resultados mostraron una diferencia parcial con los observados en cebada (*Hordeum vulgare*). En trabajos previos realizados en embriones dormidos de cebada, se observó que el contenido de ABA endógeno no cambió bajo incubaciones a 30°C, con una germinación relativamente baja. Sin embargo, cuando dichos embriones fueron incubados a 20°C, se observó un aumento en la germinación acompañado de una disminución significativa en el contenido de ABA. Por otro lado, en embriones despiertos, la germinación fue elevada y consecuente con una reducción en el contenido de ABA endógeno durante la incubación, tanto a 20°C como a 30°C (Benech-Arnold et al., 2006).

La participación de las cubiertas en la dormición de las semillas de kiwi será tratada con mayor detalle en el capítulo 4, especialmente en relación con el contenido de ABA endógeno y la sensibilidad al mismo. Sin embargo, es necesaria una breve introducción para discutir los resultados obtenidos en relación con el efecto del ácido abscísico exógeno sobre el nivel de dormición. Las cubiertas de las semillas pueden imponer dormición a través de la limitación de la entrada de oxígeno al embrión (i.e. hipoxia) (Corbineau & Côme, 1995). La hipoxia puede modificar el metabolismo del ABA a favor de su acumulación, y también puede modificar la sensibilidad al mismo (Bewley & Black, 1982; Benech-Arnold et al., 2006).

Los resultados mostraron que las cubiertas están involucradas en la dormición, probablemente imponiendo algún grado de restricción a la entrada de oxígeno al embrión. Se observó que semillas dormidas (i.e. sin estratificar) incubadas en agua destilada y con cubiertas no germinaron, pero sin cubiertas y con las mismas condiciones alcanzaron niveles de germinación relativamente elevados (Fig. 3.4, a y b). Esto coincide con resultados obtenidos en trabajos anteriores en *Actinidia deliciosa* (Windauer et al., 2016). Por otro lado, la aplicación de ácido abscísico exógeno redujo la germinación tanto en semillas con cubiertas como en semillas sin cubiertas, y con diferentes niveles de dormición, excepto en semillas dormidas con cubiertas en donde la germinación siempre fue nula (Fig. 3.4, a y b).

Por último, los resultados mostraron que la sensibilidad al ABA de las semillas cambia con el nivel de dormición. Las semillas con menor tiempo de estratificación y por ende mayores niveles de dormición mostraron menor germinación con ABA exógeno que las semillas despiertas (Fig. 3.4, a y b). Este cambio en la sensibilidad es más evidente cuando se analizan los resultados de semillas incubadas sin cubiertas. Se observó que semillas sin cubiertas, sin estratificar o estratificadas 14 días tienen niveles de germinación relativamente elevados, y en estos tratamientos la aplicación de ABA exógeno tiene un efecto inhibitorio de la germinación más pronunciado que en semillas estratificadas 28 días (Fig. 3.4, b). Estos resultados coinciden parcialmente con los resultados obtenidos por Dominguez et al. (2016) y Benech-Arnold et al. (2006). Sin embargo, en estos casos la sensibilidad al ABA cambió en relación con la temperatura de incubación.

Cuando las semillas fueron estratificadas 14 días y se incubaron sin cubiertas, mostraron menor germinación y mayor sensibilidad al ABA respecto a las semillas incubadas con cubiertas (Fig. 3.4). Esto podría explicarse por una menor capacidad de restauración de las membranas celulares en el momento de extracción de las cubiertas y en la imbibición. Estos mecanismos de restauración vinculados al potencial agua y a la temperatura del ambiente fueron ampliamente documentados (Hilhorst & Cohn, 2009). En conclusión, tanto las giberelinas como el ácido abscísico estuvieron involucrados en la atenuación e imposición de la dormición de las semillas de *Actinidia deliciosa*, respectivamente. Además, las cubiertas ejercieron un control importante sobre el nivel de dormición, lo cual será tratado con profundidad en el próximo capítulo.

## CAPITULO 4

La participación de las cubiertas de las semillas de kiwi en la disponibilidad de oxígeno para el embrión, y su relación con el contenido endógeno de ABA, la sensibilidad del embrión al ABA y el comportamiento germinativo de las semillas.

## CAPITULO 4

4. La participación de las cubiertas de las semillas de kiwi en la disponibilidad de oxígeno para el embrión, y su relación con el contenido endógeno de ABA, la sensibilidad del embrión al ABA y el comportamiento germinativo de las semillas.

## Resumen

La propagación de plántulas de kiwi mediante reproducción sexual en viveros es esencial para obtener portainjertos denominados “francos”. Sin embargo, este tipo de propagación es complicada debido a la alta dormición que presentan las semillas. Los objetivos del presente capítulo fueron investigar los mecanismos fisiológicos y la participación de las cubiertas con la dormición de las semillas de kiwi. Se evaluó cómo las cubiertas regulan la dormición al imponer hipoxia al embrión, y la sensibilidad de las semillas y el embrión a diferentes niveles de hipoxia, así como la influencia de la hipoxia en el metabolismo y la sensibilidad al ácido abscísico (ABA). Se realizaron experimentos con semillas de diferentes niveles de dormición, con y sin cubiertas, en temperaturas de incubación constante y alternadas y manipulando las concentraciones de oxígeno, evaluando la germinación, el contenido de ABA endógeno y la sensibilidad al mismo. Los resultados confirmaron que las cubiertas desempeñan un papel fundamental en la dormición. Las semillas sin estratificar tuvieron una germinación elevada cuando se les removieron las cubiertas y se incubaron con concentraciones de oxígeno iguales o superiores al 15%. Sin embargo, la germinación disminuyó cuando la concentración de oxígeno fue inferior al 15%, lo que sugiere que las cubiertas imponen dormición al interferir con la entrada de oxígeno al embrión. La sensibilidad a la hipoxia disminuyó en la medida en que las semillas tenían un menor nivel de dormición. En relación con la influencia del ABA exógeno en la dormición, se observaron cambios en la sensibilidad al mismo entre semillas sin estratificar y estratificadas, especialmente en semillas sin cubiertas. Los niveles endógenos de ABA de las semillas no mostraron un papel determinante en la regulación del nivel de dormición. En resumen, las cubiertas de las semillas fueron determinantes en la dormición al interferir con la entrada de oxígeno al embrión de las mismas, y la sensibilidad a la hipoxia y al ABA cambió según el nivel de dormición y la presencia o ausencia de cubiertas seminales.

#### 4.1. Introducción

Como se adelantó en el capítulo 1, la dormición fisiológica de las semillas puede estar impuesta por la presencia de las cubiertas, impuesta directamente al embrión, o ser una combinación de ambas. La forma en que estos mecanismos podrían estar conectados es, por ejemplo, una interferencia impuesta por las cubiertas a la entrada de oxígeno al embrión (i.e. hipoxia) lo cual interferiría tanto con el metabolismo como con la señalización de inhibidores de la germinación (e.g. ácido abscísico) (Corbineau & Côme, 1995; Bewley & Black, 1982; Benech-Arnold et al., 2006).

Algunos autores reportaron que la actividad de la enzima ABA 8'-hidroxilasa está directamente relacionada con catabolismo del ABA y que la actividad de la enzima se ve reducida bajo condiciones de hipoxia (Cutler et al., 2000), Krochko et al. (1998) determinaron que la actividad de la ABA 8'-hidroxilasa se vio severamente reducida con concentraciones de oxígeno menores a 10%. En cebada también fue informado que las estructuras que recubren al grano actúan imponiendo hipoxia al embrión: la lemma y la pálea actúan como trampas de oxígeno por ser ricas en polifenoles y éstos compuestos fenólicos capturan el oxígeno mediante una elevada actividad de la enzima polifenol oxidasa (Lenoir et al., 1986); en este caso la imposición de la dormición es tanto a nivel de modificación del metabolismo, como en la señalización del ABA (Benech-Arnold et al., 2006). Menciondo et al. (2010) también encontraron que la interferencia en el catabolismo del ABA en cebada mediada por condiciones de hipoxia en el embrión, sería a nivel de la transcripción de un gen que codifica para la enzima ABA 8'-hidroxilasa. En girasol, Dominguez et al. (2016) reportaron que a altas temperaturas (i.e. 25 o 30 °C), la dormición estaba impuesta por las cubiertas y estaba acompañada por aumentos en la sensibilidad al ABA, pero no en cambios en su concentración endógena; sin embargo, el nivel dormición disminuyó cuando se trataron las semillas enteras con hipoclorito de sodio y esto fue acompañado por una disminución en la concentración de ABA.

Los mecanismos por los cuales se modifica la sensibilidad al ABA en relación con la hipoxia mediada por las cubiertas o por factores ambientales aún son muy poco conocidos. En *Arabidopsis* y en cebada se ha descrito un mecanismo que implica una vía de proteólisis dirigida vía N-terminal; bajo condiciones de hipoxia la actividad de esta vía se reduce y permite un incremento en la respuesta al ABA a través de una estabilización de un factor de respuesta al etileno (Menciondo et al., 2016; Holman et al., 2009).

La dormición en semillas de kiwi es fisiológica y está fuertemente mediada por las cubiertas (Windauer et al., 2016). Las cubiertas en esta especie están formadas por la pared del ovario (integumento) que se lignifica (Hopping, 1976).

En el presente capítulo se evaluó el comportamiento germinativo de las semillas en relación con: 1) la participación de las cubiertas de las semillas en la disponibilidad de oxígeno para el embrión; 2) la relación de las cubiertas y la disponibilidad de oxígeno para el embrión con el contenido endógeno de ABA; y 3) la relación entre la sensibilidad del embrión al ABA, con las cubiertas y la disponibilidad de oxígeno para el embrión.

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Condiciones generales

Los tratamientos de los experimentos del presente capítulo contaron con 3 repeticiones de 25 semillas cada una. Al inicio del experimento las semillas se contaron manualmente y fueron dispuestas en placas de Petri de 9 cm de diámetro con dos discos de filtro Whatman No. 3 y 5 ml de agua destilada. Las placas fueron envueltas en papel film para evitar la pérdida de humedad y en bolsas negras para evitar la exposición a la luz, y fueron estratificadas a 5°C por diferentes períodos en cada experimento.

Finalizados los períodos de estratificación, las semillas se repicaron a bandejas plásticas de 9 cm de largo x 6 cm de ancho x 6 cm de profundidad para su posterior incubación, las bandejas se prepararon con una base de algodón cubierta por 1 disco de filtro Whatman No. 3, y 55 a 60 ml de agua destilada (Fig. 4.1, b).

Para la remoción de las cubiertas (i.e. tegumento lignificado) de las semillas se utilizó una Lupa binocular Marca Nikon (Nikon SMZ 10; Nikon, Tokio, Japón). Las cubiertas se removieron mediante pinza y bisturí y las semillas cuya integridad se veía afectada eran descartadas (Fig. 4.1, a).

Para cambiar la concentración de oxígeno por debajo de 21% se utilizó una cámara plástica transparente semi-permeable (35 cm de ancho x 30 cm de profundidad x 15 cm de alto), con agua destilada en la base, (Modelo C-274, BioSpherix, Estados Unidos) usando un controlador de oxígeno (PRO-OX Modelo 110, BioSpherix, Estados Unidos). Este controlador tenía una entrada de gas nitrógeno conectado a un tubo de gas nitrógeno, y también una salida de gas nitrógeno conectada a la cámara semi-permeable y un sensor de oxígeno que fue colocado dentro de la cámara semi-permeable. Al comienzo la concentración de oxígeno dentro de la cámara semi-permeable fue de 21% (i.e. concentración de oxígeno en la atmósfera). Para alcanzar y mantener la concentración de oxígeno deseada menor a 21% dentro de la cámara, el controlador de oxígeno registró la concentración de oxígeno dentro de la cámara a través del sensor y permitió que el gas nitrógeno ingresara. Así la concentración de oxígeno seleccionada se alcanzó y se mantuvo por desplazamiento forzado del oxígeno presente dentro de la cámara con un flujo continuo de gas nitrógeno. Las bandejas de los tratamientos con concentraciones de oxígeno menor al 21% fueron colocadas dentro de la cámara semi-permeable. Para los tratamientos con concentración de oxígeno de 21% (i.e. concentración de oxígeno en la atmósfera) se llevó a cabo en contenedores plásticos

transparentes semi-permeables (35 cm de ancho x 40 cm de largo x 10 cm de alto, con agua en la base). Las bandejas de estos tratamientos (i.e. 21% de oxígeno) fueron colocadas dentro de los contenedores (Fig. 4.1, c y d).

Los contenedores y la cámara semi-permeable fueron colocados dentro de una incubadora con la temperatura correspondiente a cada tratamiento (Fig. 4.1, c y d). Se detallará posteriormente en “tratamientos” las particularidades de cada experimento.

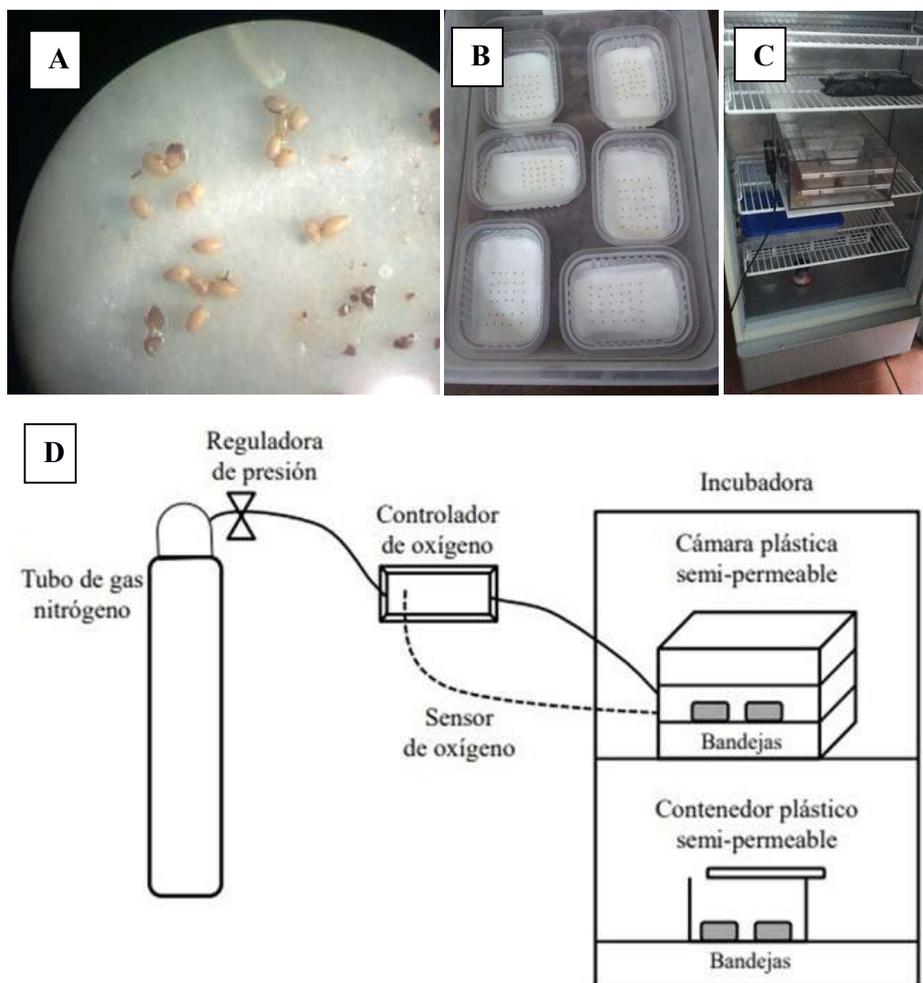


Figura 4.1: A: Semillas de kiwi sin cubiertas en placa de Petri. B: Bandejas con semillas de kiwi sin cubiertas en contenedor para tratamientos con 21% de oxígeno. C: Incubadora con cámara semi-permeable para tratamientos de hipoxia. D: Esquema demostrativo del funcionamiento del control de oxígeno para tratamientos de hipoxia (Esquema adaptado de Dominguez et al., 2019).

#### **4.2.2. Test de germinación**

Dado que la cámara semi-permeable no podía ser manipulada para no cambiar la concentración de oxígeno seleccionada, las semillas germinadas se contaban al final de cada período de incubación (i.e. 20 días desde el inicio de la incubación, donde se alcanza el plateau de germinación). El criterio para contar una semilla como germinada era cuando la radícula era superior a 1 mm de longitud.

#### **4.2.3. Tratamientos**

##### **4.2.3.1. Participación de las cubiertas y efecto de la disponibilidad de oxígeno.**

Las semillas fueron estratificadas durante 0, 14 y 28 días a 5°C. Finalizado el periodo de estratificación a la mitad de las semillas se les quitaron las cubiertas, después tanto semillas con cubiertas como sin cubiertas, fueron repicadas a bandejas plásticas (ver “condiciones generales”). Luego en estas bandejas las semillas fueron incubadas por 20 días en cámaras con temperatura constante (25°C) o temperaturas alternadas (20/30°C), y con diferentes concentraciones de oxígeno en el ambiente (5, 10, 15 y 21%). Luego de la incubación se contaron las semillas que germinaron.

##### **4.2.3.2. Efecto de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno en el embrión sobre el contenido de ABA endógeno.**

Para evaluar el grado de participación de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno para el embrión sobre el contenido de ABA endógeno, se estratificaron semillas durante 0 y 28 días con el fin de tener respuestas vinculadas a alto y bajo nivel de dormición (respectivamente). Una mitad se incubó con cubiertas y otra mitad sin cubiertas, a temperaturas alternadas (20/30°C). La incubación se realizó con concentraciones de oxígeno de 5% (i.e. hipoxia) y 21% (i.e. concentración de oxígeno atmosférica).

Durante los períodos de incubación se retiraron las muestras a las 0 (sin incubar), 24, 120 y 168 horas (cuando comenzó la germinación), inmediatamente se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta ser liofilizadas. Posteriormente, las muestras se liofilizaron, se molieron con un mortero, se pesaron y almacenaron a -20°C hasta que se realizó la determinación del contenido endógeno de ABA.

Paralelamente, se estratificaron semillas durante 0 y 28 días y luego se incubaron con y sin cubiertas a 20/30°C, con concentraciones de 5 y 21% de oxígeno, para realizar los 8

test de germinación correspondientes. De esta manera se obtuvieron los porcentajes de germinación vinculados a cada medición de contenido endógeno de ABA, y se aseguró que la última extracción de 168 h (7 días) sea antes de que comience la germinación.

Para la determinación de ABA endógeno, a cada muestra se le agregó agua destilada (100:1 v/p) y se la dejó durante toda la noche sobre un agitador a 4°C. Después cada muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 4 min y se analizaron 50 µl del sobrenadante por muestra in duplo con un radioinmunoensayo, como se describe en Steinbach et al. (1995), usando un anticuerpo mono-clonal AFR MAC 252 (Quarrie et al., 1988) y ABA tritiado (Amersham Biosciences, Reino Unido).

#### **4.2.3.3. Sensibilidad de las semillas al efecto inhibitor de la germinación del ácido abscísico aplicado en forma exógena: efecto de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno al embrión.**

Para evaluar la sensibilidad de las semillas al efecto inhibitor de la germinación del ácido abscísico aplicado en forma exógena, el efecto de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno al embrión: las semillas fueron estratificadas durante 0 y 28 días con el fin de tener respuestas vinculadas a alto y bajo nivel de dormición, respectivamente. La mitad de las semillas fueron incubadas con cubiertas y otra mitad sin cubiertas, a temperaturas alternadas (20/30°C). La incubación se realizó con concentraciones de ABA exógeno de 0 (agua destilada), 4, 8, y 12 µM, y con diferentes concentraciones de oxígeno en el ambiente (2, 5, 10, 15 y 21%).

#### **4.2.4. Análisis estadísticos**

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

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Participación de las cubiertas y efecto de la disponibilidad de oxígeno

Cuando las semillas se incubaron bajo temperaturas constantes no hubo germinación en ninguno de los tratamientos excepto cuando fueron estratificadas 28 días y la concentración de oxígeno fue del 21%. Sin embargo, esta germinación fue baja (i.e. 35% y 21% para semillas enteras y sin cubiertas, respectivamente). Es por esta razón que a continuación se mostrarán únicamente los resultados obtenidos bajo incubación con temperaturas alternadas (20/30°C).

Cuando las semillas se incubaron bajo concentraciones de oxígeno del 5% su germinación fue prácticamente nula en todos los tratamientos (i.e. en semillas con diferente nivel de dormición con o sin cubiertas) (Fig. 4.2, a y b).

En semillas con cubiertas y estratificadas 14 días (i.e. parcialmente dormidas) los resultados mostraron que al incubar las mismas con 10% de oxígeno comienza a detectarse germinación (aproximadamente 15%), y los máximos porcentajes de germinación se alcanzan con 15 y 21% de oxígeno (aproximadamente 60%) (Fig. 4.2, a). En los tratamientos de semillas incubadas con cubiertas y 28 días de estratificación (i.e. despiertas) se alcanzaron los máximos porcentajes de germinación; e incubarlas con 10% de oxígeno fue suficiente para lograr una germinación del 60%. Lo cual fue similar a lo alcanzado con 14 días de estratificación y 21% de oxígeno, mientras que cuando estas semillas fueron incubadas con 15 y 21% la germinación fue máxima y cercana al 100% (Fig. 4.2, a).

Las semillas sin cubiertas y sin estratificación (i.e. dormidas), no germinaron al incubarlas con 5% de oxígeno y se observó un bajo nivel de germinación con 10%. Sin embargo, al incubarlas con 15 y 21% de oxígeno alcanzaron porcentajes de germinación cercanos al 60% (Fig. 4.2, b). Cuando se estratificaron 14 días estas semillas sin cubiertas alcanzaron aproximadamente un 30% de germinación al incubarlas con 10% de oxígeno, y porcentajes de germinación elevados (aproximadamente 90%) con 15 y 21% de oxígeno. Las semillas que fueron estratificadas 28 días y se incubaron sin cubiertas, fueron el único caso en el que se detectó germinación con 5% de oxígeno. Además, cuando se incubaron con 10% de oxígeno mostraron porcentajes de germinación similares a los tratamientos de 15 y 21% de oxígeno, en los cuales la germinación alcanzó porcentajes cercanos al 80% (sin diferencias significativas, test de Tukey con  $P \leq 0,05$ ) (Fig. 4.2, b).

En la medida en que las semillas con diferente nivel de dormición con y sin cubiertas, fueron sometidas a condiciones de oxígeno decrecientes (i.e. incremento de la hipoxia), la germinación disminuyó. Sin embargo, las semillas con cubiertas fueron más sensibles a la hipoxia. Además, en todos los tratamientos se observó que no hubo diferencias significativas entre la germinación de semillas incubadas con 15% de oxígeno, respecto de las incubadas con condiciones de oxígeno atmosféricas (21% O<sub>2</sub>) (Fig. 4.2).

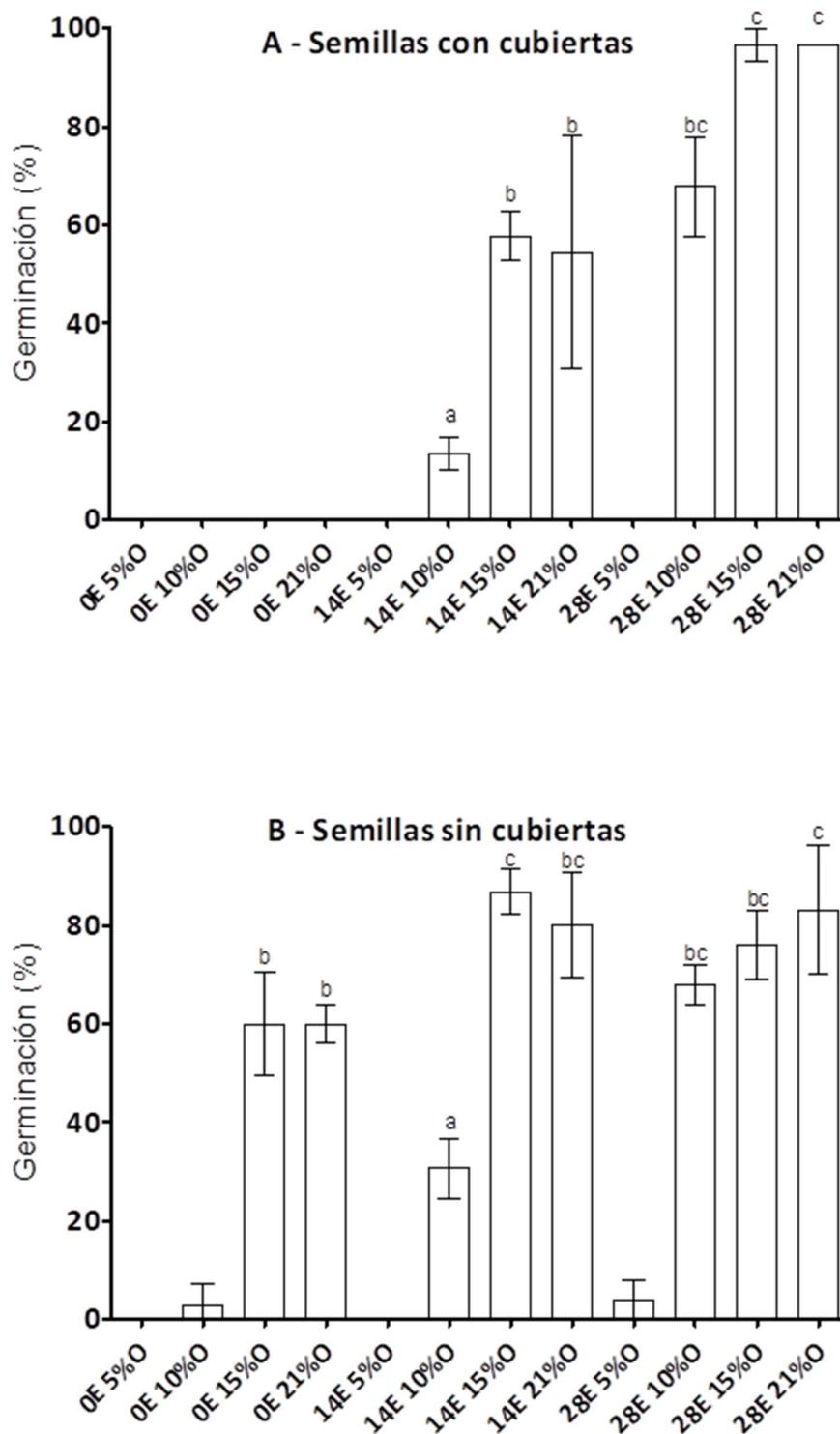


Figura 4.2 Germinación (%) para semillas incubadas bajo temperaturas alternadas (20/30°C); estratificadas 0, 14 y 28 días (0E, 14E y 28E, respectivamente), bajo concentraciones de oxígeno de 5, 10, 15 y 21% (5%O, 10%O, 15%O y 21%O, respectivamente), para A: Semillas con cubiertas y B: Semillas sin cubiertas. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas y letras diferentes significan diferencias significativas entre medias para cada gráfico (Test de Tukey  $P \leq 0,05$ ).

#### **4.3.2. Efecto de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno en el embrión sobre el contenido de ABA endógeno.**

Como se observó en el experimento que antecede, las semillas con cubiertas fueron más sensibles a la hipoxia y además hubo cambios en la sensibilidad a la hipoxia dependientes del nivel de dormición. Para evaluar si estos cambios en la sensibilidad a la hipoxia fueron a través de mecanismos que intervienen en el metabolismo del ABA, se midió el contenido de ABA endógeno durante el periodo de incubación, y hasta el inicio de la germinación.

Los niveles de germinación de las semillas fueron en general más altos cuando fueron estratificadas (i.e. despiertas) en todos los tratamientos, excepto cuando fueron incubadas con cubiertas y con una concentración de oxígeno del 5% en donde no hubo germinación significativa (Fig. 4.3).

Los resultados mostraron que semillas sin estratificar (i.e. dormidas), tenían mayor contenido de ABA endógeno que semillas estratificadas 28 días (Fig. 4.4, a y b).

Las semillas sin estratificar con cubiertas no germinaron al ser incubadas con diferente concentración de oxígeno (5% y 21%, respectivamente). Sin embargo, cuando a las semillas no estratificadas se les removió las cubiertas tuvieron un 15% de germinación al incubarlas con 5% de oxígeno, mientras que cuando se incubaron con 21% de oxígeno, la germinación alcanzó niveles de 60% (Fig. 4.3).

En cuanto al contenido ABA endógeno en relación con su evolución horaria, en semillas sin estratificar se observó un descenso en el contenido de ABA en la medida que avanzó el tiempo de incubación. Por otro lado, en semillas estratificadas la tendencia fue opuesta (i.e. aumento en el contenido de ABA endógeno desde las 0 hasta las 168 horas de incubación) (Fig. 4.4, a y b).

##### **Semillas sin estratificar**

Las semillas sin estratificar (i.e. dormidas) e incubadas con cubiertas, no germinaron en ninguna de las dos concentraciones de oxígeno evaluadas (5 y 21%) (Fig. 4.3). Sin embargo, en ambos tratamientos se observó un descenso del contenido de ABA desde las 0 hasta las 120 horas de incubación, en donde se estabilizó. En el tratamiento de 21% de oxígeno se observó un leve aumento desde las 120 a las 168 horas (Fig. 4.4, a).

Cuando las semillas sin estratificar fueron incubadas sin cubiertas con una concentración de oxígeno del 5% hubo aproximadamente un 15% de germinación, mientras que fue del 60% en semillas incubadas con 21% de oxígeno (Fig. 4.3). Al

comparar el ABA endógeno inicial, éste fue significativamente más bajo en comparación con semillas en las mismas condiciones, pero con cubiertas. La hipoxia no pareció afectar el contenido endógeno de ABA. El contenido de ABA en estos tratamientos, no tuvo una tendencia consistente durante los diferentes tiempos de incubación. Tampoco hubo diferencias significativas en el contenido de ABA, entre semillas incubadas con 5 y con 21% de oxígeno (Fig. 4.4, a).

### **Semillas con 28 días de estratificación**

Los resultados mostraron que en semillas estratificadas 28 días (i.e. despiertas), con cubiertas e incubadas con una concentración de oxígeno del 5%, la germinación fue fuertemente inhibida (2,7%) (Fig. 4.3). En este tratamiento el nivel de ABA endógeno inicial es significativamente más bajo que en el mismo tratamiento, pero con semillas sin estratificar (40 vs. 145 pg ABA \* mg peso seco de semilla<sup>-1</sup>) (Fig. 4.4, a y b). En estas semillas el contenido de ABA, a diferencia de lo que sucedió en semillas sin estratificar, aumento con el tiempo de incubación (Fig. 4.4, b).

Cuando las semillas fueron estratificadas 28 días e incubadas con cubiertas bajo una concentración de 21% de oxígeno, mostraron una germinación cercana al 95% (Fig. 4.3). En este caso el nivel de ABA endógeno inicial también fue significativamente menor al del mismo tratamiento, pero con semillas sin estratificar (40 vs. 145 pg ABA \* mg peso seco de semilla<sup>-1</sup>). Sin embargo, aumenta levemente a 60 pg a las 24 horas de incubación, para luego mantenerse relativamente constante hasta las 168 horas (Fig. 4.4, b).

En los tratamientos en que las semillas estratificadas por 28 días y sin cubiertas fueron incubadas con 5% y 21% de oxígeno, la germinación fue elevada, 68 y 83%, respectivamente (Fig. 4.3). En ambos casos el contenido de ABA endógeno inicial fue bajo (20 pg ABA \* mg peso seco de semilla<sup>-1</sup>). En semillas que se incubaron con una concentración de oxígeno de 5%, hubo un leve aumento del ABA a las 24 horas para luego mantenerse relativamente constante hasta las 168 horas. En cambio, cuando la concentración de oxígeno en la incubación fue de 21% el ABA siempre aumentó, alcanzando a las 168 horas una concentración de ABA endógeno de 90 pg ABA \* mg peso seco de semilla<sup>-1</sup> (Fig. 4.4, b).

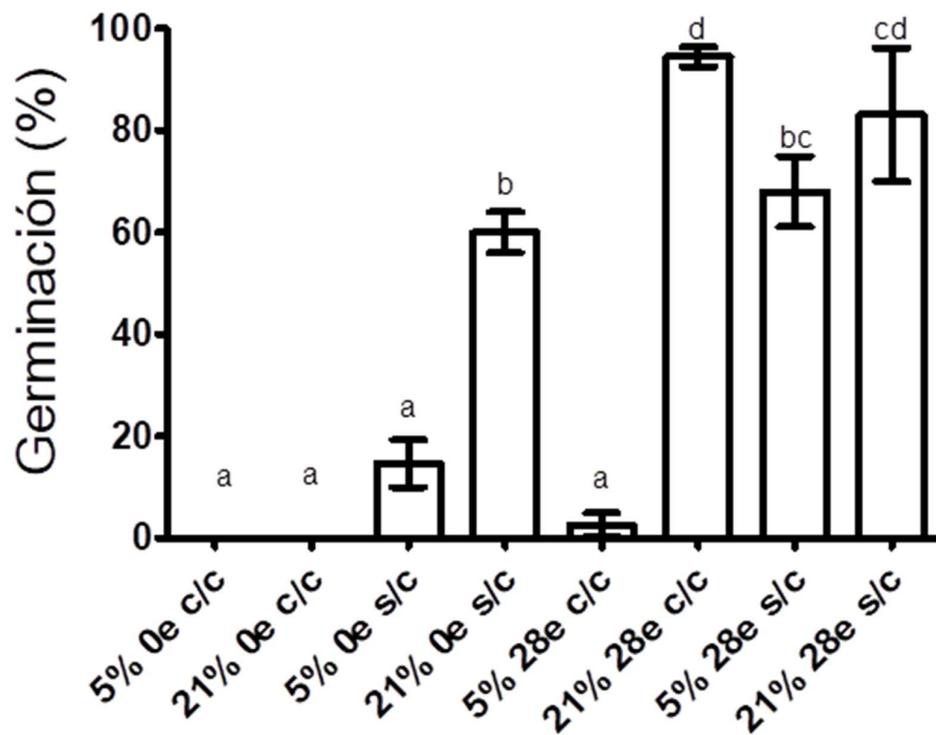


Figura 4.3 Germinación (%) para semillas incubadas con concentraciones de oxígeno de 5 y 21%, con cubiertas (c/c) y sin cubiertas (s/c), y estratificadas 0 días (0e) y 28 días (28e). Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas y letras diferentes significan diferencias significativas entre medias (Test de Tukey  $P \leq 0,05$ ).

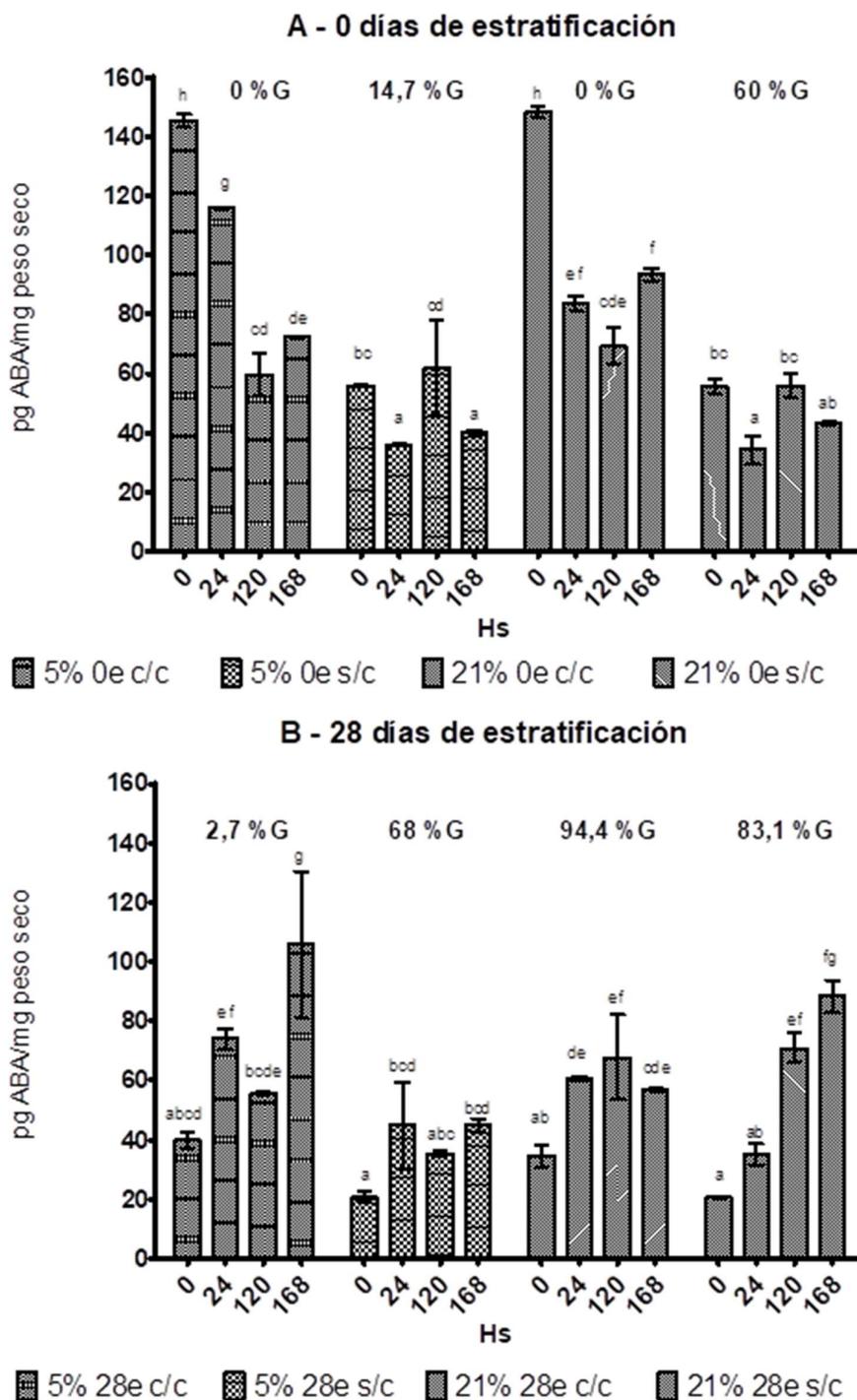


Figura 4.4 Contenido de ácido abscísico (pg de ABA) por mg de peso seco de semillas), medidos a las 0, 24, 120 y 168 h de incubación a 20/30°C para A: semillas sin estratificar y B: semillas estratificadas 28 días; bajo diferentes concentraciones de oxígeno en la incubación (5 y 21%), incubadas con cubiertas (c/c) y sin cubiertas (s/c). Los porcentajes en el margen superior muestran la germinación media descrita en la figura 4.3. Las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas y letras diferentes significan diferencias significativas entre medias para cada gráfico (Test de Tukey  $P \leq 0,05$ ).

### 4.3.3. Sensibilidad de las semillas al ácido abscísico exógeno: efecto de las cubiertas y de la disponibilidad de oxígeno al embrión.

Para evaluar si el aumento en la sensibilidad a la hipoxia en semillas con distintos niveles de dormición es debido a un aumento en la sensibilidad al ABA; se realizaron experimentos donde se midió la germinación de semillas despiertas y dormidas, con y sin cubiertas, bajo diferentes concentraciones de ABA y distintas concentraciones de oxígeno.

Los resultados mostraron que semillas enteras sin estratificar (i.e. dormidas) no germinaron independientemente del tratamiento a las que fueron sometidas (datos no mostrados). Tampoco hubo germinación cuando las semillas fueron incubadas con 2% de oxígeno (datos no mostrados).

Las semillas sin estratificar y sin cubiertas no germinaron en ninguno de los tratamientos, a excepción de cuando fueron incubadas en agua destilada con 21% de oxígeno, en donde presentaron una germinación de aproximadamente 60% (Fig. 4.5).

Cuando las semillas estratificadas 28 días (i.e. despiertas) fueron incubadas en agua destilada (i.e. 0  $\mu\text{M}$  de ABA), sin cubiertas y con concentraciones de 15 y 21% de oxígeno, mostraron una germinación alta y similar de aproximadamente 90% (Fig. 4.5, d y c); mientras que cuando fueron incubadas con concentraciones de oxígeno de 5 y 10% su germinación disminuyó presentando valores de aproximadamente 45% y 65%, respectivamente (Fig. 4.5, a y b). La germinación de estas semillas despiertas y sin cubiertas, decreció significativamente con concentraciones crecientes de ABA cuando se incubaron con 21% de oxígeno (aproximadamente 30, 20 y 10% con 4, 8 y 12  $\mu\text{M}$  de ABA, respectivamente) (Fig. 4.5, d). Además, la germinación de estas semillas fue casi completamente inhibida cuando la incubación fue con concentraciones de oxígeno menores a 21% (Fig. 4.5).

Los resultados mostraron que las semillas estratificadas 28 días (i.e. despiertas), e incubadas con cubiertas en agua (i.e. 0  $\mu\text{M}$  de ABA) con 15 y 21% de oxígeno, mostraron una germinación elevada (aproximadamente 90%). Sin embargo, cuando fueron incubadas con concentraciones de oxígeno de 10 y 5% la germinación fue prácticamente nula (Fig. 4.5).

Las semillas estratificadas 28 días, e incubadas con cubiertas y 21% de oxígeno, no presentaron diferencias significativas en la germinación entre las incubadas en agua (0  $\mu\text{M}$  de ABA) y con las concentraciones de 4 y 8  $\mu\text{M}$  de ABA (Test de Tukey  $P \leq 0,05$ ). Sin embargo, la germinación fue completamente inhibida con dosis de 12  $\mu\text{M}$  (Fig. 4.5,

d). Por otra parte, cuando estas semillas fueron incubadas con 15% de oxígeno, la germinación disminuyó significativamente cuando fueron incubadas bajo dosis crecientes de ABA (Fig. 4.5, c).

Estos resultados sugieren que la hipoxia en semillas despiertas incrementa la sensibilidad al ABA, tanto en semillas con cubiertas como en semillas sin cubiertas, pero en estas últimas es más notable.

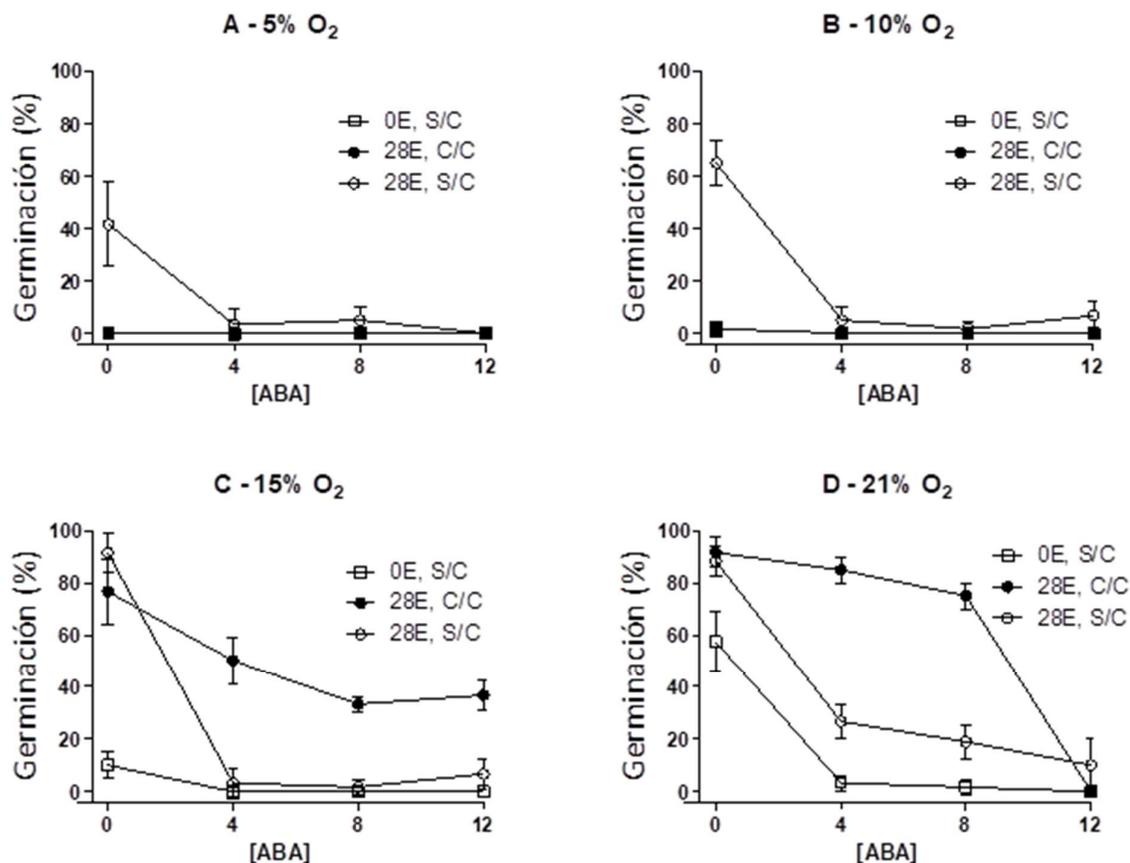


Figura 4.5 Porcentaje de germinación en función de la concentración de ABA exógeno aplicado ( $\mu\text{M}$ ) en semillas estratificadas 28 días (28E) e incubadas con cubiertas (C/C) y sin cubiertas (S/C), y en semillas estratificadas 0 días (0E) e incubadas sin cubiertas (S/C); todos los tratamientos bajo incubación con temperaturas alternadas (20/30°C) con concentraciones de oxígeno de: A: 5%, B: 10%, C: 15% y D: 21%. Las líneas conectan los puntos y las barras representan el desvío estándar de la media para tres réplicas.

#### 4.4. Discusión

Como se mencionó en el capítulo 1 las semillas de kiwi presentan dormición fisiológica y la misma está regulada hormonalmente y puede estar mediada por las cubiertas. En el presente capítulo se profundizó sobre los mecanismos fisiológicos involucrados que se desarrollaron en el capítulo 3, con énfasis en la relación entre los mismos y la participación de las cubiertas. Los objetivos fueron evaluar cómo las cubiertas regulan la dormición de las semillas imponiendo hipoxia al embrión (i.e. sensibilidad de las semillas y del embrión a diferentes niveles de hipoxia), y cómo la hipoxia interfiere en el metabolismo y en la sensibilidad al ácido abscísico. La participación del ABA y su rol en la imposición de la dormición está ampliamente documentada en numerosas especies (Himmelbach et al., 2003; Bewley, 1997; Finkelstein et al., 2002). Sin embargo, no hay antecedentes en kiwi. Para cumplir los objetivos se desarrollaron experimentos en semillas con diferente nivel de dormición con y sin sus cubiertas, bajo diferentes temperaturas de incubación, y manipulando las concentraciones de oxígeno en el ambiente; y se evaluó como es afectada la germinación, y el contenido de ácido abscísico endógeno y la sensibilidad al mismo.

Los resultados obtenidos confirmaron que las cubiertas tienen una participación importante en el mantenimiento de la dormición, coincidiendo con lo encontrado por Windauer et al. (2016) y con los resultados del capítulo 3. Las semillas de kiwi sin estratificar (i.e. dormidas), presentaron niveles de germinación relativamente elevados (mayores a 60%) cuando a las mismas se les removieron las cubiertas, y se las incubó con concentraciones de oxígeno iguales o mayores a 15%. Sin embargo, la remoción de las cubiertas no fue suficiente para sustituir a las temperaturas alternadas en la incubación como factor terminador de la dormición. Además, la germinación disminuyó en semillas sin cubiertas cuando la concentración de oxígeno en la incubación fue menor al 15%. Esto sugiere que las cubiertas imponen dormición mediante una interferencia en la entrada de oxígeno al embrión, y no por una interferencia en la salida de sustancias inhibitoras (Fig. 4.2, a y b).

El gradiente de concentraciones de oxígeno utilizado (5, 10, 15 y 21%) permite inferir que la sensibilidad a la hipoxia disminuye en la medida en que las semillas tienen menor nivel de dormición (i.e. las semillas despiertas son menos sensibles a la hipoxia). Esto se manifiesta, por ejemplo, a través de elevados niveles de germinación en semillas sin cubiertas parcialmente dormidas y con concentraciones de oxígeno similares a los

utilizados en semillas despiertas (Fig. 4.2, b). Otros autores estudiaron los cambios en la sensibilidad a la hipoxia en semillas de especies anuales, en estos trabajos las diferencias encontradas están relacionadas con las temperaturas de incubación y no con los niveles de dormición, como se observó en los resultados obtenidos en el presente capítulo (Fig. 4.2, a y b). Además, en estas especies la sensibilidad a la hipoxia difiere entre variedades y genotipos. Por ejemplo, en girasol Dominguez et al. (2019) encontraron una elevada sensibilidad a la hipoxia en semillas de un genotipo de línea endocriada incubadas a 30°C. Sin embargo, en este trabajo las semillas de un híbrido comercial mostraron una sensibilidad muy baja a la hipoxia, incubadas tanto a 12 como a 30°C. Por el contrario, en melón, Edelstein et al. (1995) reportaron que la sensibilidad a la hipoxia se incrementa cuando las semillas se incuban a bajas temperaturas. La solubilidad del oxígeno (y su disponibilidad) en el medio acuoso es mayor a bajas temperaturas, pero los mecanismos fisiológicos involucrados con la sensibilidad a la hipoxia difieren entre genotipos y son en general desconocidos (Edelstein & Welbaum, 2011).

Para ahondar sobre los posibles mecanismos fisiológicos asociados a la sensibilidad a la hipoxia, se evaluó la acumulación de ABA endógeno de las semillas en el período inicial de la incubación hasta el inicio de la germinación, con y sin remoción de cubiertas, con diferentes niveles de dormición y bajo condiciones de oxígeno hipóxicas y atmosféricas. Otros autores han reportado que la hipoxia actúa en favor de la acumulación de ABA a través de diferentes vías. Una de las más conocidas es la desregulación de la enzima ABA 8'-hidroxilasa, la cual interviene en el catabolismo del ABA (Cutler et al., 2000). Por lo tanto, es de esperar que bajo condiciones hipóxicas generadas artificialmente o a través de las cubiertas de las semillas, el ABA endógeno tienda a favor de su acumulación, y entonces este incremento en su concentración tenga como consecuencia menores niveles de germinación (i.e. expresión de mayor nivel de dormición).

Al evaluar la evolución del contenido de ABA endógeno los resultados no fueron consistentes y tampoco mostraron relación con la hipoxia (Fig. 4.4, a y b). El efecto de la hipoxia mediada por las cubiertas o por cambios en la concentración de oxígeno del ambiente, no siempre tuvo como consecuencia cambios en los niveles de ABA en favor de su acumulación.

Por ejemplo, semillas despiertas con cubiertas incubadas bajo concentraciones de oxígeno atmosféricas, o sin cubiertas, pero incubadas con 5% de oxígeno, presentaron

elevados niveles de germinación y la evolución del ABA fue en favor de su acumulación en ambos tratamientos y sin presentar diferencias significativas entre ellos al final del período de medición (Fig. 4.4, b). En cambio, al evaluar los tratamientos de semillas dormidas, con cubiertas bajo concentraciones de oxígeno atmosféricas, o sin cubiertas, pero con 5% de oxígeno, los niveles de germinación fueron muy bajos y el ABA endógeno en ambos casos fue significativamente menor entre el comienzo y el final del período de medición. Sin embargo, en semillas dormidas si hubo diferencias entre tratamientos, presentando mayor contenido de ABA las semillas incubadas con cubiertas y 21% de oxígeno en el ambiente (Fig. 4.4, a). Por otro lado, los resultados mostraron que semillas sin cubiertas incubadas bajo condiciones de oxígeno atmosféricas tanto dormidas como despiertas, tuvieron porcentajes de germinación relativamente elevados en ambos casos; pero en el caso de semillas dormidas el ABA endógeno fue menor y estable durante el periodo de medición (Figs. 4.3 y 4.4, a y b). En conclusión, en kiwi la concentración de ABA endógeno no tiene una relación clara con el nivel de dormición de las semillas, y la hipoxia no siempre regula en favor de su acumulación.

Para terminar de dilucidar el mecanismo por el cual la hipoxia (mediada por las cubiertas) impone dormición, se evaluó la sensibilidad de las semillas al ABA. Para alcanzar este objetivo se utilizaron dosis crecientes de ABA exógeno en la incubación, con concentraciones de 0 (agua destilada), 4, 8 y 12  $\mu\text{M}$ , en semillas sin estratificar (i.e. alto nivel de dormición) y semillas estratificadas 28 días (i.e. bajo nivel de dormición). La incubación fue con temperaturas alternadas (20/30°C) y con distintas concentraciones de oxígeno en el ambiente (2, 5, 10, 15 y 21%), en semillas con y sin cubiertas. Las semillas utilizadas tenían un alto nivel de dormición al iniciar el experimento dado que sin estratificar y bajo condiciones óptimas en la incubación no presentaron germinación; al mismo tiempo tenían una alta viabilidad dado que estratificando las mismas por 28 días y con óptimas condiciones en la incubación se alcanzaron niveles de germinación cercanos al 100%.

Los resultados mostraron que la hipoxia incrementó la sensibilidad al ABA, por ejemplo, en semillas estratificadas 28 días (i.e. despiertas) e incubadas sin cubiertas y con 15 % de oxígeno, el ABA exógeno inhibió significativamente la germinación con respecto a las semillas incubadas con 21 % de oxígeno. Además, se observó que semillas despiertas, pero con cubiertas, también fueron más sensibles al efecto inhibitor

de la germinación del ABA exógeno cuando se incubaron con 15% de oxígeno (Fig.4.5, c y d).

Las semillas incubadas con concentraciones de oxígeno atmosféricas y semillas incubadas con hipoxia (i.e. 15%), despiertas y con cubiertas, mostraron menor sensibilidad al ABA, y por ende mayor germinación. Esto podría explicarse como ya se discutió en el capítulo 3, por una menor capacidad de restauración de las membranas celulares de las semillas sin cubiertas en el momento de la imbibición. Estos mecanismos de restauración vinculados generalmente al potencial agua y a la temperatura del ambiente fueron ampliamente documentados (Hilhorst & Cohn, 2009, Andrade et al., 2015). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Dominguez et al. (2019) quienes observaron que en girasol la hipoxia en la incubación incrementa la sensibilidad al ABA, aunque estos cambios podrían variar dependiendo del genotipo y de la temperatura de incubación.

En conclusión, con los resultados obtenidos se puede inferir que la imposición de la dormición de las semillas de kiwi está vinculada en gran medida al efecto del ácido abscísico, principalmente por cambios en la sensibilidad al mismo. Además, estos cambios en la sensibilidad están relacionados con la presencia de las cubiertas de las semillas, las cuales están involucradas en la difusión de oxígeno hacia el embrión.

## CAPITULO 5

Discusión general.

## CAPITULO 5

### 5. Discusión general.

#### Resumen

En el presente capítulo se retoma el marco conceptual de la problemática abordada y se contrastan las hipótesis planteadas en el capítulo 1, se plantean algunas de las contribuciones más relevantes al estado de conocimiento actual, y se definen algunas posibles líneas de investigación futuras derivadas de los resultados obtenidos.

### **5.1. Marco conceptual de la problemática abordada**

La dormición de las semillas es una condición interna que impide la germinación de las mismas, incluso en condiciones térmicas, hídricas y gaseosas adecuadas (Benech-Arnold et al., 2000). Esta característica es de gran importancia adaptativa en especies silvestres de climas templados, ya que les permite sobrevivir bajo condiciones desfavorables, pero en el caso de especies domesticadas se considera una característica indeseable (Bewley, 1997). La presencia de dormición en semillas de especies frutales puede ocasionar retrasos y dificultades en la obtención de plantas en el vivero principalmente por la necesidad de obtención de pies de injertos “francos”, los cuales presentan raíces más vigorosas y de crecimiento precoz. Por lo tanto, resulta crucial investigar y aplicar estrategias efectivas para superar la dormición en estas especies. Más aún esto adquiere mayor relevancia en kiwi, especie objeto de estudio de este trabajo, considerando que además presenta dificultades para enraizar de modo agámico (Bellini & Monastra, 1986; Sale, 1985).

Las semillas de kiwi presentan un alto grado de dormición al ser dispersadas, necesitan de un período de estratificación húmeda para disminuir su nivel de dormición y tienen una respuesta elevada a factores terminadores de la dormición. Estos factores terminadores, como pulsos de luz de alta relación rojo/rojo lejano o temperaturas alternadas, son necesarios para promover la germinación una vez aliviado el nivel de dormición (Windauer et al., 2016).

Es por estas razones que las semillas de kiwi son un buen modelo para estudiar las bases fisiológicas de la dormición y desarrollar metodologías para su eliminación, y como punto de partida para dilucidar los mecanismos que operan en especies frutales perennes. Estas semillas presentan dormición fisiológica y la misma puede ser causa de dormición embrionaria y/o dormición impuesta por las cubiertas, y está regulada hormonalmente (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). El rol de las cubiertas generalmente está relacionado con una restricción a la entrada de oxígeno al embrión, lo cual interfiere en el metabolismo y en la sensibilidad al ácido abscísico (Corbineau & Côme, 1995; Benech-Arnold et al., 2006).

Si bien no hay suficientes estudios en kiwi, en otras especies está ampliamente documentado que hormonas como el ácido abscísico y las giberelinas, están involucradas en el mantenimiento y en la liberación de la dormición, respectivamente; siendo crucial el equilibrio entre ambos (Ali-Rachedi et al., 2004; Jacobsen et al., 2002; Kucera et al., 2005). Los mecanismos que operan no son sólo a través de los niveles

endógenos de estas hormonas, sino que además pueden actuar a través de cambios en la sensibilidad a las mismas (Derkx & Karssen, 1993).

Con respecto al rol de las cubiertas, es conocido en varias especies que las mismas imponen una restricción de entrada de oxígeno al embrión (i.e. hipoxia), la cual interfiere con la actividad de la enzima ABA 8'-hidroxilasa encargada del catabolismo de la hormona (Cutler et al., 2000; Krochko et al., 1998). Los mecanismos por el cual la hipoxia mediada por cubiertas interviene en la sensibilidad de las semillas al ABA aún no están del todo claros, pero hay evidencia en cebada y en *Arabidopsis* que sugiere que bajo estas condiciones se reduce la actividad de una vía de proteólisis dirigida vía N-terminal y esto permite un incremento en la respuesta al ABA a través de una estabilización de un factor de respuesta al etileno (Mendiondo et al., 2016; Holman et al., 2009).

En esta tesis se propuso: i) estudiar el efecto de la temperatura de estratificación sobre la tasa de salida de la dormición, medida a través de cambios en el rango de ciclos de temperaturas alternadas que permiten la germinación. Ligado a esto, generar un modelo predictivo para kiwi sobre la base del concepto de “tiempo térmico de estratificación”, una herramienta de simulación matemática que permite relacionar los cambios en los niveles de dormición con la temperatura y el tiempo de estratificación. Esta herramienta permitirá desarrollar metodologías para la producción de plántulas a escala de vivero (Capítulo 2). ii) Estudiar la participación del ácido abscísico y de las giberelinas en el proceso de imposición y salida de la dormición, respectivamente (Capítulo 3). iii) Evaluar la participación de las cubiertas de la semilla en relación con la disponibilidad de oxígeno en el embrión y el contenido de ABA endógeno y su sensibilidad (Capítulo 4).

## 5.2. Contraste de hipótesis planteadas

Hipótesis 1: El tiempo y la temperatura de estratificación de las semillas de *A. deliciosa* determinan su nivel de dormición. Se predice que: con mayor tiempo y/o menor temperatura de estratificación (dentro de un rango determinado), las semillas tendrán un menor nivel de dormición. Un menor nivel de dormición determinará un aumento en la sensibilidad de las semillas a factores terminadores de la dormición, como las temperaturas alternadas.

Esta Hipótesis se puso a prueba en el Capítulo 2 el cual permitió el cumplimiento del objetivo específico 2: “Generar un modelo predictivo para Kiwi, sobre la base del concepto de “tiempo térmico de estratificación”, una herramienta de simulación matemática que permite relacionar los cambios en los niveles de dormición con la temperatura y el tiempo de estratificación”.

Los resultados obtenidos además de permitir el desarrollo del modelo predictivo proporcionaron evidencia suficiente para aceptar la hipótesis planteada. Se encontró que la estratificación a temperaturas más bajas produce cambios más rápidos en la sensibilidad de las semillas a los ciclos de temperaturas alternadas, lo que indica que se alcanza un menor nivel de dormición con temperaturas más bajas (e.g. 2 y 5°C). Del mismo modo, se observó que el tiempo de estratificación influye en la sensibilidad de las semillas a las temperaturas alternadas. Los resultados mostraron que hay una disminución en el número de ciclos requeridos para saturar la respuesta de germinación a medida que aumenta el tiempo de estratificación (e.g. estratificando a 2°C, 21 y 25 días fueron suficientes para alcanzar porcentajes de germinación cercanos al 95% con sólo 3 ciclos en la incubación) (Fig. 2.1, 2.2 y 2.3). Esto en resumen indica que una menor temperatura y un mayor tiempo de estratificación resulta en un menor nivel de dormición, y que esto genera un cambio en los requerimientos de ciclos de temperaturas alternadas necesarios para alcanzar mayores niveles de germinación. Sin embargo, los resultados también mostraron que el rango de temperaturas y tiempos explorados en el experimento no fueron suficientes para producir una pérdida completa del requerimiento de temperaturas alternadas para la terminación de la dormición (Fig. 2.1, f).

Hipótesis 2: En *A. deliciosa* las GAs y el ABA están involucradas en la atenuación y en la imposición de la dormición, respectivamente. Específicamente se predice que: i) semillas sin estratificar tienen una alta capacidad de sintetizar ABA que las mantiene en dormición y una baja sensibilidad al efecto promotor de las GAs; ii) semillas estratificadas pierden su capacidad de sintetizar ABA y/o aumentan la capacidad de catabolizar el ABA. Además, adquieren una alta sensibilidad al efecto promotor de las GAs y/o disminuye la sensibilidad al efecto inhibidor del ABA.

Esta hipótesis se puso a prueba en el Capítulo 3: “Factores endógenos involucrados en la dormición: el papel del ácido abscísico y de las giberelinas”.

Con los resultados de este capítulo se pudo obtener evidencia suficiente para aceptar la hipótesis planteada. Sin embargo, las predicciones fueron acertadas, pero de forma parcial.

Se pudo corroborar la participación de las GAs como hormona promotora de la germinación (i.e. aliviando la dormición), y como se predijo, la sensibilidad a las mismas en semillas dormidas es prácticamente nula independientemente de la temperatura de incubación (Fig. 3.1, a y b). Consecuentemente semillas parcialmente dormidas (estratificadas 14 días), adquieren una alta sensibilidad a las GAs (Fig. 3.1, c y d), y en semillas despiertas también se encontró que aumenta la sensibilidad a través de una disminución en el requerimiento de temperaturas alternadas como factor terminador de la dormición (Fig. 3.1, e y f).

Específicamente, la predicción que no se corroboró es que semillas sin estratificar tienen una alta capacidad de sintetizar ABA (manteniendo su dormición), y que semillas estratificadas pierden su capacidad de sintetizar ABA y/o aumentan la capacidad de catabolizar el ABA. Los resultados del presente capítulo mostraron que no hay diferencias significativas en el nivel de ABA endógeno entre semillas que fueron estratificadas 28 días (i.e. despiertas) y semillas sin estratificar (i.e. dormidas), independientemente de la temperatura de incubación (Fig. 3.2).

En último término, se predijo que las semillas estratificadas tendrían menor sensibilidad al efecto inhibidor del ABA, efectivamente esto se pudo corroborar dado que la sensibilidad al ácido abscísico (ABA) cambió en función del nivel de dormición de las semillas. El hecho de que las semillas con menor tiempo de estratificación (mayor dormición) sean más sensibles al efecto inhibidor del ABA sugiere que la sensibilidad al ABA está relacionada con la regulación de la dormición. Esto se observa claramente en semillas sin cubiertas, dado que al removerlas se puede obtener germinación en semillas

sin estratificar. En semillas con cubiertas es difícil observar diferencias dado que la germinación en semillas dormidas es nula incluso en agua (i.e. no se pueden evaluar dosis crecientes de ABA exógeno, y por ende tampoco la sensibilidad al mismo) (Fig. 3.4).

En resumen, la sensibilidad al ABA parece estar vinculada a la regulación de la dormición, respaldando así la predicción relacionada con la sensibilidad al ABA en las semillas con diferentes niveles de dormición. Esta observación es consistente con la hipótesis inicial y sugiere que la interacción entre las GAs y el ABA desempeña un papel importante en la regulación de la dormición en las semillas de *Actinidia deliciosa*.

Hipótesis 3: Las cubiertas de las semillas de *A. deliciosa* imponen dormición, a través de una restricción a la entrada de oxígeno al embrión y/o una restricción a la salida de sustancias que inhiben la germinación (e.g. ABA).

La hipótesis planteada se puso a prueba en el Capítulo 4: “La participación de las cubiertas de las semillas de kiwi en la disponibilidad de oxígeno para el embrión, y su relación con el contenido endógeno de ABA, la sensibilidad del embrión al ABA y el comportamiento germinativo de las semillas”.

Los experimentos realizados se adentraron en una investigación sobre el papel de las cubiertas de las semillas y su participación en la dormición, destacando la posible restricción de oxígeno al embrión y/o la interferencia en la salida de sustancias inhibitorias, como el ácido abscísico.

Los resultados se obtuvieron a partir de experimentos con semillas dormidas y despiertas, incubándolas con y sin cubiertas, con distintas concentraciones de oxígeno en el ambiente, y con posterior evaluación de la germinación. De esta manera, se evaluó la sensibilidad de las semillas a la hipoxia, el contenido de ABA endógeno y la sensibilidad al mismo. Los resultados obtenidos fortalecen la hipótesis inicial, revelando que las cubiertas desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la dormición, actuando a través de la imposición de hipoxia al embrión y afectando la sensibilidad al ABA.

Una de las conclusiones notables es que la sensibilidad a la hipoxia disminuyó proporcionalmente con un menor nivel de dormición, señalando una correlación directa entre la intensidad de la dormición y la respuesta a la hipoxia. La remoción de las cubiertas resultó en un aumento significativo en los niveles de germinación, respaldando la idea de que las cubiertas imponen dormición al interferir con la entrada de oxígeno al embrión (Fig. 4.2).

En cuanto a la regulación hormonal, los experimentos arrojaron resultados variados en relación con la acumulación de ABA. Aunque las condiciones hipóxicas generadas por las cubiertas pueden influir en la regulación del ABA, no se observaron cambios consistentes en los niveles de esta hormona en respuesta a la hipoxia (Fig. 4.4).

La sensibilidad al ABA fue evaluada mediante la aplicación de dosis crecientes de ABA exógeno, revelando una relación compleja entre la hipoxia, la presencia de cubiertas y la sensibilidad al ABA, lo que afecta directamente el nivel de dormición (Fig. 4.5).

En conclusión, los resultados apoyan la hipótesis de que las cubiertas de las semillas de kiwi son protagonistas en la imposición de la dormición, principalmente a través de la

restricción de oxígeno al embrión y la modulación de la sensibilidad al ABA. Estos hallazgos no solo tienen relevancia para la comprensión de los mecanismos subyacentes a la dormición en esta especie perenne, sino que también ofrecen una perspectiva valiosa para optimizar las prácticas agrícolas y mejorar la producción de plantas de kiwi en el contexto de la producción a escala de vivero.

### 5.3. Contribución al avance del conocimiento

La contribución de los resultados obtenidos en esta tesis, aportan significativamente al avance del conocimiento en el campo de la dormición de semillas, particularmente en el contexto de una especie como *Actinidia deliciosa* (kiwi). A continuación, se destacan algunas de las contribuciones más relevantes.

El modelo matemático desarrollado en el capítulo 2 (Un modelo basado en el concepto de “tiempo térmico de estratificación”: una herramienta matemática para la eliminación de la dormición a escala de vivero), contribuye significativamente al conocimiento en este campo. En primer lugar, identifica factores clave que influyen en el proceso de germinación, destacando la importancia de la estratificación, como factor aliviador, y de las temperaturas alternadas como factor terminador de la dormición. La confirmación de los resultados con datos independientes respalda la consistencia y validez de los hallazgos, aludiendo además a trabajos previos sobre la misma especie.

Además, este capítulo presenta un valioso aporte al desarrollar y adaptar un modelo matemático existente, éste se convierte en una herramienta esencial para predecir cambios en la germinación en función del tiempo térmico de estratificación. La aplicación de este modelo proporciona una base sólida para el diseño de procedimientos y técnicas de germinación eficientes, contribuyendo así al avance teórico y práctico en este ámbito.

En términos de aplicaciones prácticas, el modelo sugiere la optimización de las prácticas de vivero, utilizando el concepto de “tiempo térmico de estratificación” como medida cuantitativa para determinar la duración y las condiciones ideales de estratificación. Este enfoque busca reducir la incertidumbre en la elección de combinaciones óptimas de temperatura y tiempo, lo que se traduce en una mayor eficiencia en la producción de plántulas de kiwi en viveros. El capítulo no solo identifica factores determinantes en la germinación de semillas de kiwi y confirma hallazgos previos, sino que también desarrolla un modelo matemático aplicable y propone estrategias para mejorar las prácticas de vivero. Estas contribuciones no solo avanzan en el conocimiento teórico, sino que también tienen implicaciones directas en la optimización de procesos para la producción exitosa de plántulas de kiwi.

En cuanto a los mecanismos fisiológicos específicos encontrados la investigación realizada identifica y caracteriza algunos mecanismos específicos mediante los cuales las cubiertas de las semillas imponen dormición en kiwi. Este nivel de detalle proporciona una comprensión más profunda de los procesos fisiológicos involucrados

en la dormición de las semillas de kiwi, un aspecto que no está completamente dilucidado en la literatura existente. La conexión entre la hipoxia, las cubiertas de las semillas y la sensibilidad al ácido abscísico (ABA) es un hallazgo notable, que la sensibilidad a la hipoxia disminuya proporcionalmente con el nivel de dormición de las semillas, señala una correlación directa entre la intensidad de la dormición y la respuesta a la hipoxia. Esta relación compleja se suma al conocimiento actual sobre cómo estos factores interactúan para regular la dormición de las semillas. La literatura existente puede tener información limitada sobre la interacción específica entre estos elementos y aún más en especies perennes como el kiwi.

La variabilidad observada en la acumulación de ABA en respuesta a la hipoxia, especialmente en presencia de cubiertas, agrega una capa de complejidad al entendimiento de la regulación hormonal durante la dormición. Estos resultados podrían desafiar o complementar estudios previos que han observado la relación entre ABA y dormición en otras especies.

La evidencia encontrada de que las cubiertas imponen dormición mediante una interferencia en la entrada de oxígeno al embrión y esto es subyacente al nivel de dormición es una contribución única. Esta perspectiva específica sobre el papel de las cubiertas en la dormición puede proporcionar información valiosa para la comprensión de los mecanismos involucrados que se conocen hasta el momento.

Por último, dado que los estudios sobre dormición por lo general se centran en especies anuales, los resultados de esta investigación son particularmente valiosos para la contribución al avance del conocimiento sobre dormición de semillas en especies perennes.

#### **5.4. Futuras líneas de investigación**

Las futuras líneas de investigación deberían estar centradas en los mecanismos moleculares subyacentes a la dormición de las semillas de *Actinidia deliciosa*. De esta manera se podrían explorar aspectos más detallados y específicos para obtener una comprensión más completa de los mecanismos involucrados encontrados en el presente trabajo.

Algunas posibles direcciones para una futura investigación podrían incluir la exploración del perfil de expresión génica durante diferentes etapas de la dormición en las semillas de kiwi, identificando genes clave que están regulados diferencialmente durante la dormición, especialmente aquellos relacionados con la respuesta a la hipoxia y la regulación del ABA.

Aplicando técnicas de ARN-seq y proteómica se podría obtener una visión integral de los cambios a nivel de transcripción y traducción durante la dormición, e identificar las rutas de señalización y las proteínas clave involucradas en la respuesta a la hipoxia y la regulación del ABA. De la misma manera se podría investigar cómo factores ambientales como la temperatura y la disponibilidad de oxígeno modulan la expresión génica durante la dormición, y explorar la interacción entre los factores ambientales y la expresión génica en el contexto de la respuesta a la hipoxia.

Estas líneas de investigación podrían proporcionar una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares y la expresión génica que subyacen a la dormición en las semillas de kiwi, brindando información valiosa para la mejora de las prácticas agrícolas y el desarrollo de estrategias para el manejo de la dormición en esta especie.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M. H., Bonnet, M., & Sotta, B. (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.
- Arnold, C. Y. (1959). The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, *74*, 430–445.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (1998). *Seeds: ecology biogeography and evolution of dormancy and germination*. Academic Press.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, *14*(February 2007), 1–16. <https://doi.org/10.1079/SSR2003150>
- Batlla, D., & Benech-Arnold, R. L. (2003). A quantitative analysis of dormancy loss dynamics in *Polygonum aviculare* L. seeds: Development of a thermal time model based on changes in seed population thermal parameters. *Seed Science Research*, *13*(1), 55–68. <https://doi.org/10.1079/ssr2002124>
- Batlla, D., Grundy, A., Dent, K. C., Clay, H. A., & Finch-Savage, W. E. (2009). A quantitative analysis of temperature-dependent dormancy changes in *Polygonum aviculare* seeds. *Seed Science Research*, *49*, 428–438.
- Batlla, D., Verges, V., & Benech-Arnold, R. (2003). A quantitative analysis of seed responses to cycle-doses of fluctuating temperatures in relation to dormancy: Development of a thermal time model for *Polygonum aviculare* L. seeds. *Seed Science Research*, *13*(3), 197–207. <https://doi.org/10.1079/SSR2003137>
- Bellini, E., & Monastra, F. (1986). *Propagazione, problemi vivaistici, scelta varietale e miglioramento genetico dell'actinidia*. Cassa di Risparmio di Verona Vicenza e Bulluno.
- Benech-Arnold, R. L. (2007). *Árboles frutales. Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento* (G. O. Sozzi, Ed.). Editorial Facultad de Agronomía.
- Benech-Arnold, R. L., Ghersa, C. M., Sanchez, R. A., & Insausti, P. (1990). Temperature effects on dormancy release and germination rate in *Sorghum halepense* (L.) Pers. seeds: a quantitative analysis. *Weed Research*, *30*(2), 81–89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1990.tb01690.x>
- Benech-Arnold, R. L., 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(6), 1423–1430. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj122>
- Benech-Arnold, R. L., & Sánchez, R. A. (1995). Modeling weed seed germination. In J. Kigel & G. Galili (Eds.), *Seed development and germination*. (pp. 545–566). Marcel Dekker.
- Benech-Arnold, R., Sanchez, R., Forcella, F., Kruk, B., & Ghersa, C. (2000). Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research*, 67, 105–122.
- Bewley, J. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9(7), 1055–1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>
- Bewley, J. D., & Black, M. (1982). Physiology and biochemistry of seeds. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Bewley, J. D., & Black, M. (1994). Dormancy and the Control of Germination. In *Seeds: physiology of development and germination*. (pp. 199–271). Plenum Press.
- Bewley, J. D., Bradford, K., Hilhorst, H., & Nonogaki, H. (2013). *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. (3rd edition). Springer.
- Blake, P. S., Browning, G., Benjamin, L. J., & Mander, L. N. (2000). Gibberellins in seedlings and flowering trees of *Prunus avium* L. *Phytochemistry*, 53, 519–528.
- Bouwmeester, H. J., & Karssen, C. M. (1992). The dual role of temperature in the regulation of the seasonal changes in dormancy and germination of seeds of *Polygonum persicaria* L. *Oecologia*, 90, 88–94.
- Çelik, H., Zenginbal, H., & Özcan, M. (2006). Enhancing germination of kiwifruit seeds with temperature, medium and gibberellic acid. *Hort. Sci.*, 33, 39–45.
- Corbineau, F., & Côme, D. (1995). Control of seed germination and dormancy by the gaseous environment. In J. Kigel & G. Galili (Eds.), *Seed Development and Germination* (pp. 397–424). <https://doi.org/10.1201/9780203740071>
- Costa, G., Testolin, R., & Vizzotto, G. (1993). Kiwifruit pollination: An unbiased estimate of wind and bee contribution. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 21(2), 189–195. <https://doi.org/10.1080/01140671.1993.9513767>
- Covatta, F., & Borscak, J. (1988). *El kiwi, cultivo alternativo*. Hemisferio Sur.

- Cutler, A. J., Rose, P. A., Squires, T. M., Loewen, M. K., Shaw, A. C., Quail, J. W., Krochko, J. E., & Abrams, S. R. (2000). Inhibitors of abscisic acid 8'-hydroxylase. *Biochemistry*, *39*, 13614–13624.
- Debeaujon, I., & Koorneef, M. (2000). Gibberellin Requirement for Arabidopsis Seed Germination Is Determined Both by Testa Characteristics and Embryonic Abscisic Acid. *Plant Physiology*, *122*(2), 415–424. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.415>
- Derx, M. P. M., & Karssen, C. M. (1993). Effects of light and temperature on seed dormancy and gibberellin stimulated germination in *Arabidopsis thaliana* - Studies with gibberellin deficient and gibberellin-insensitive mutants. *Physiologia Plantarum*, *89*, 360–368.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., & Tablada, M. (2014). *InfoStat versión 2014* (2014). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Dominguez, C. P., Batlla, D., Rodríguez, M. V., Windauer, L. B., Gerbaldo, M., & Benech-Arnold, R. L. (2016). Pericarp-imposed dormancy in sunflower: Physiological basis, impact on crop emergence, and removal at an industrial scale. *Crop Science*, *56*(2), 716–726. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.06.0335>
- Dominguez, C. P., Rodríguez, M. V., Batlla, D., García De Salamone, I. E., Mantese, A. I., Andreani, A. L., & Benech-Arnold, R. L. (2019). Sensitivity to hypoxia and microbial activity are instrumental in pericarp-imposed dormancy expression in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Seed Science Research*. <https://doi.org/10.1017/S0960258519000060>
- Edelstein, M., Corbineau, F., Kigel, J., & Nerson, H. (1995). Seed coat structure and oxygen availability control low-temperature germination of melon (*Cucumis melo*) seeds. *Physiologia Plantarum*, *93*(3). <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1995.930306.x>
- Edelstein, M., & Welbaum, G. E. (2011). Seed O<sub>2</sub> uptake and germination of cold-tolerant and cold-intolerant cultivars of muskmelon. *Crop Science*, *51*(2). <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.05.0285>
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *The New Phytologist*, *171*, 501–523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Finkelstein, R., Gampala, S., & Rock, C. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, *14*, S15–S45.

- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular Aspects of Seed Dormancy\*. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 387–415. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740>
- Footitt, S., Clay, H. A., Dent, K., & Finch-Savage, W. E. (2014). Environment sensing in spring-dispersed seeds of a winter annual *Arabidopsis* influences the regulation of dormancy to align germination potential with seasonal changes. *New Phytologist*, 202(3), 929–939.
- Footitt, S., Douterelo-Soler, I., Clay, H., & Finch-Savage, W. E. (2011). Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20236–20241. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116325108>
- Footitt, S., Huang, Z., Clay, H. A., Mead, A., & Finch-Savage, W. E. (2013). Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. *Plant Journal*, 74(6), 1003–1015.
- Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E., & Jullien, M. (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbagnifolia* post imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta*, 210, 279–285.
- Harman, J. E. (1981). Kiwifruit maturity. *Orchardist NZ*, 54, 126–130.
- Hilhorst, H. (1995). A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5, 61–73.
- Hilhorst, H. W. M., & Cohn, M. A. (2009). Are cellular membranes involved in the control of seed dormancy? In *Dormancy in plants: from whole plant behavior to cellular control*. <https://doi.org/10.1079/9780851994475.0275>
- Himelrick, D., & Powell, A. (1998). *Kiwifruit production guide*. Alabama University.
- Himmelbach, A., Yang, Y., & Grill, E. (2003). Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 470–479.
- Holman, T. J., Jones, P. D., Russell, L., Medhurst, A., Tomas, S. U., Talloji, P., Marquez, J., Schmutz, H., Tung, S. A., Taylor, I., Footitt, S., Bachmair, A., Theodoulou, F. L., & Holdsworth, M. J. (2009). The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4549–4554. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810280106>

- Hopping, M. E. (1976). Structure and development of fruit and seeds in Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis* Planch.). *New Zealand Journal of Botany*, 14(November), 63–68. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1976.10428651>
- Jacobsen, J. V., Pearce, D. W., Poole, A. T., Pharis, R. P., & Mander, L. N. (2002). Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiologia Plantarum*, 115, 428–441.
- Karssen, C. M. (1982). Seasonal patterns of dormancy in weed seeds. *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination*. Amsterdam, Elsevier Biomedical., 243–270.
- Kermode, A. R. (2005). Role of abscisic acid in seed dormancy. *Plant Growth Regul.*, 24, 319–344.
- Koornneef, M., Bentsink, L., & Hilhorst, H. W. M. (2002). Seed dormancy and germination. In *Current opinion in plant biology* (Vol. 5, Issue 1, pp. 33–36). [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(01\)00219-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(01)00219-9)
- Krochko, J. E., Abrams, G. D., Loewen, M. K., Abrams, S. R., & Cutler, A. J. (1998). (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiology*, 118, 849–860.
- Kruk, B. C., & Benech-Arnold, R. L. (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, M. A., & Leubner-Metzger, G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15(4), 281–307. <https://doi.org/10.1079/SSR2005218>
- Lawes, G. S., & Anderson, D. R. (1980). Influence of temperature and gibberellic acid on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) seed germination. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 8(3–4), 277–280. <https://doi.org/10.1080/03015521.1980.10426272>
- Lenoir, C., Corbineau, F., & Côme, D. (1986). Barley (*Hordeum vulgare*) seed dormancy as related to glumella characteristics. *Physiologia Plantarum*, 68(2). <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb01930.x>
- Lewak, S. (2011). Metabolic control of embryonic dormancy in apple seed: Seven decades of research. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0524-8>

- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., & Zhang, J. (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany*, *61*(11), 2979–2990. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq125>
- Malavert, C., Batlla, D., & Benech-Arnold, R. L. (2021). Light sensitivity changes during dormancy induction in *Polygonum aviculare* L. seeds: development of a predictive model of annual changes in seed-bank light sensitivity in relation to soil temperature. *Weed Research*, *61*(2), 115–125. <https://doi.org/10.1111/wre.12463>
- Mattiuz, B., Ferri, V. C., Fachinello, J. C., & Nedel, J. L. (1996). Efeitos do ácido giberélico e da baixa temperatura na germinação de sementes de kiwi (*Actinidia deliciosa*, A. Chev.) cultivar bruno. *Scientia Agricola*, *53*(1), 4.
- Mendiondo, G. M., Gibbs, D. J., Szurman-Zubrzycka, M., Korn, A., Marquez, J., Szarejko, I., Maluszynski, M., King, J., Axcell, B., Smart, K., Corbineau, F., & Holdsworth, M. J. (2016). Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(1), 40–50. <https://doi.org/10.1111/pbi.12334>
- Mendiondo, G. M., Leymarie, J., Farrant, J. M., Corbineau, F., & Benech-Arnold, R. L. (2010). Differential expression of abscisic acid metabolism and signaling genes induced by seed-covering structures or hypoxia in barley (*Hordeum vulgare* L.) grains. *Seed Science Research*, *20*, 69–77. <https://doi.org/10.1017/S0960258509990262>
- Millar, A. A., Jacobsen, J. V., Ross, J. J., Helliwell, C. A., Poole, A. T., Scofield, G., Reid, J. B., & Gubler, F. (2006). Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 80-hydroxylase. *The Plant Journal*, *45*, 942–954.
- Motulsky, H. J. (2003). *GraphPad Prism* (4.0). GraphPad Software Inc.
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2003). ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.*, *8*, 213–217.
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., & Kamiya, Y. (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. In *Seed Science Research* (Vol. 20, Issue 2). <https://doi.org/10.1017/S0960258510000012>
- Quarrie, S. A., Whitford, P. N., Appleford, N. E. J., Wang, T. L., Cook, S. K., Henson, I. E., & Loveys, B. R. (1988). A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in

- crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta*, 173(3), 330–339.  
<https://doi.org/10.1007/BF00401020>
- Sale, P. (1985). *General Requirements, Propagation of Vines in: Kiwifruit Culture*. Government printer.
- Samaría, R., Covatta, J., Insausti, P., & Izaguirre, M. (2011). *Las cubiertas de las semillas de kiwi (Actinidia deliciosa cv. Bruno) intervienen en el control de su germinación*.
- Steinbach, H. S., Benech-arnold, R. L., Kristof, G., Sanchez, R. A., & 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(6). <https://doi.org/10.1093/jxb/46.6.701>
- Steinbach, H. S., Benech-Arnold, R. L., & Sanchez, R. a. (1997). Hormonal Regulation of Dormancy in Developing Sorghum Seeds. *Plant Physiology*, 113(1), 149–154. <https://doi.org/10.1104/pp.113.1.149>
- Tanimoto, G. (1994). *Propagation in: Kiwifruit, Growing and Handling*. University of California.
- Vegis. (1964). Dormancy in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 15, 185–224.
- Windauer, L. B., Insausti, P., Biganzoli, F., Benech-Arnold, R., & Izaguirre, M. M. (2016). Dormancy and germination responses of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) seeds to environmental cues. *Seed Science Research*, 26(4), 342–350. <https://doi.org/10.1017/S0960258516000192>
- Yamaguchi, S. (2008). Yamaguchi, S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 225-251. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1).
- Yoshioka, T., Endo, T., & Satoh, S. (1998). Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell and Physiology.*, 39, 307–312.