

Efectos del ambiente térmico explorado durante la etapa de llenado y almacenaje sobre el nivel de dormición en frutos de girasol (*Helianthus annuus* L.).

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal con Orientación en Cultivos Extensivos*

María Paula Bodrone

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires - 2005

Lugar de trabajo: Estación Experimental Monsanto Fontezuela



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

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Diego Batlla

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

María Verónica Rodríguez

Licenciada en Biología (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Biología (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Sebastián Arisnabarreta Dupuy

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Diego Batlla

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Natalia Gabriela Izquierdo

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Mar del Plata)

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

JURADO

Carlos Omar Gosparini

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Rosario)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Rosario)

Fecha de defensa de la tesis: 24 de abril de 2014

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer:

A mis padres Liliana y Héctor, a mis hermanas Antonella y Denise, y a Pedro, por el apoyo que me brindaron, su paciencia, ayuda e invaluable compañía.

A Diego Batlla por su guía y su gran aporte en mi formación.

A Verónica Rodríguez, Sebastián Arisnabarreta y Roberto Benech-Arnold por sus valiosos consejos.

A Guillermo Videla y Juan Manuel de Santa Eduvigis por incentivar-me a emprender este proyecto.

A la Universidad de Buenos Aires y a Monsanto Argentina que financiaron este trabajo.

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

María Paula Bodrone

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	17
Planteo del problema y antecedentes	17
Dormición: definición y clasificación	18
Efectos del ambiente térmico en la determinación del nivel de dormición	19
Efectos de las estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición.....	21
Control hormonal de la dormición: efecto del ácido abscísico y las giberelinas	23
Objetivos del proyecto	25
Hipótesis	26
Estructura de la tesis	26
CAPÍTULO 2: EFECTOS DEL AMBIENTE TÉRMICO EXPLORADO DURANTE LA ETAPA DE LLENADO SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN EN FRUTOS DE GIRASOL	28
Introducción	28
Materiales y métodos	30
Sitio de los ensayos y material vegetal.....	30
Generación de ambientes térmicos diferenciales durante la etapa de llenado y su relación con el nivel de dormición.....	31
Evaluación del efecto de las diferentes estructuras del fruto	33
Evaluación de la sensibilidad al ABA	34
Pruebas de germinación	35
Análisis estadísticos	35
Resultados	35
Efecto del ambiente térmico durante la etapa de llenado sobre el nivel de dormición de los frutos a cosecha	35
Efecto de las diferentes estructuras del fruto de girasol en la determinación del nivel de dormición a cosecha y su relación con el ambiente térmico explorado por los frutos durante la etapa de llenado ...	47
Sensibilidad al ABA en función del ambiente térmico explorado por los frutos durante el llenado y su relación con el nivel de dormición a cosecha	51
Discusión y conclusiones	52

CAPÍTULO 3: EFECTO DEL AMBIENTE TÉRMICO EXPLORADO DURANTE LA ETAPA DE ALMACENAJE POST-COSECHA SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN EN FRUTOS DE GIRASOL.....	58
Introducción.....	58
Materiales y métodos.....	60
Material vegetal	60
Exposición de los frutos a diferentes ambientes térmicos durante el almacenaje post-cosecha. Su relación con el patrón de salida de la dormición y la contribución de las diferentes estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición	61
Exposición de los frutos a diferentes ambientes térmicos durante la etapa de almacenaje post-cosecha. Su relación con los cambios en la sensibilidad al ABA, GAs y etileno, con el contenido endógeno de ABA y con el patrón de salida de la dormición	62
Pruebas de germinación	63
Análisis estadísticos	63
Resultados	64
Efectos del ambiente térmico durante el almacenaje post-cosecha y de las estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición.....	64
Sensibilidad al ABA, GAs y etileno y contenido endógeno de ABA en función del ambiente térmico durante el almacenaje post-cosecha y su relación con el patrón de salida de la dormición	74
Discusión y conclusiones	83
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN GENERAL	91
Efectos del ambiente térmico explorado durante la etapa de llenado y almacenaje post-cosecha sobre el nivel de dormición en frutos de girasol	92
Efecto de las estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición y su relación con el ambiente térmico durante el llenado y el almacenaje	95
Ambiente térmico, regulación hormonal, y su relación con el nivel de dormición	98
Implicancias agronómicas de los resultados obtenidos.....	101
Futuras investigaciones derivadas de los resultados obtenidos.....	102
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
ANEXO.....	109

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Caracterización del ambiente térmico, radiativo y fotoperiódico durante la etapa de llenado de los frutos en las diferentes fechas de siembra del Experimento 1. El valor de fotoperíodo fue determinado a los 15 días desde primera antesis. Los valores entre paréntesis indican el desvío estándar. Los datos fueron tomados de una estación meteorológica ubicada a 200 metros de las parcelas experimentales.	36
Cuadro 2.2. Caracterización del ambiente térmico durante la aplicación de los tratamientos del experimento 2. Los datos fueron tomados por medio de dataloggers ubicados dentro de cada carpa. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Los valores entre paréntesis indican el desvío estándar.	39
Cuadro 2.3. Caracterización del ambiente térmico durante la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos (desde los 13 hasta los 26 días DDA, AT1), la segunda etapa (desde los 27 hasta los 46 DDA, AT2), ambas etapas (desde los 13 hasta los 46 DDA, AT1,2) y tratamiento testigo (T). Los datos fueron tomados por medio de dataloggers ubicados dentro de cada carpa. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Los valores entre paréntesis indican el desvío estándar.	43
Cuadro 2.4. Humedad relativa media diaria para la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos (desde los 13 hasta los 26 DDA, AT1), la segunda etapa (desde los 27 hasta los 46 DDA, AT2), ambas etapas (desde los 13 hasta los 46 DDA AT1,2) y tratamiento testigo (T). El valor entre paréntesis corresponde al desvío estándar.	45
Cuadro 3.1. Medios y temperaturas de incubación de achenios, semillas y embriones almacenados a 5 y 25°C durante 60 días (medios 1 a 7) ú 80 días (medios 1, 8, 9 y 10).	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1. Germinación final (proporción de la población evaluada) a 13°C de incubación, en función de los días desde la cosecha en frutos que desarrollaron a 24.4°C (azul), 26.1°C (rojo) y 31.6°C (verde). Las barras representan los errores estándar (Extraído de Fonseca, 2000).	20
Fig. 1.2. Sección longitudinal de un aquenio de girasol. Extraído de Aguirrezábal y Pereyra (1998).	22
Fig. 1.3. Porcentaje de germinación de aquenios (▲) y de embriones (■) cosechados a diferentes momentos post-antesis e incubados a 25°C (Extraído de Benech-Arnold, 2004, adaptado de Le Page-Degivry y Garelo, 1992, y Corbineau <i>et al.</i> , 1990).	23
Fig. 2.1. Parentales del híbrido DK4045 utilizados en los experimentos (A y B). Aquenio liso de una planta del híbrido DK4045 en estadio fenológico R5.5 (Schneiter y Miller, 1981) (C).	30
Fig. 2.2. Carpas utilizadas en los tratamientos de alta temperatura (izquierda) y techos utilizados en el tratamiento control de menor temperatura (derecha).	33
Fig. 2.3. Cajas de Petri con muestras de semillas (<i>i.e.</i> embriones con cubierta seminal verdadera) (izquierda), y embriones desnudos (derecha).	34
Fig. 2.4. Temperatura media diaria medida desde las 10 hs hasta las 18 hs para la fecha de siembra temprana (línea gruesa), intermedia (línea delgada) y tardía (línea punteada) en función de los días desde primera antesis. Las líneas sobre el gráfico indican la duración del período de llenado hasta madurez fisiológica en cada una de las fechas de siembra. Los valores entre paréntesis en la referencia indican la temperatura media de 10 a 18 hs para todo el período.	37
Fig. 2.5. Dinámica del llenado de los aquenios provenientes de la fecha de siembra temprana (círculos), intermedia (triángulos), y tardía (cuadrados). Las flechas indican el momento de madurez comercial (MC) para cada caso. Las barras verticales indican el error estándar. La ecuación que corresponde a las rectas de ajuste para la fecha temprana, intermedia y tardía es $y = 2.2x - 8.3$ ($R^2 = 0.92$); $y = 2x - 4.5$ ($R^2 = 0.88$); $y = 1.1x - 1.6e-11$ ($R^2 = 0.79$), respectivamente.	37
Fig. 2.6. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios provenientes de la fecha de siembra temprana (círculos), intermedia (triángulos) y tardía (cuadrados), en función de los días desde cosecha. Las barras indican el error estándar. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.	38
Fig. 2.7. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios provenientes de la fecha de siembra temprana (círculos), intermedia (triángulos) y tardía (cuadrados), en función de los días desde cosecha. Las barras indican el error estándar. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.	39
Fig. 2.8. Temperatura media diaria medida desde las 10 hs hasta las 18 hs para el tratamiento de alta temperatura durante el llenado (línea llena), y para el tratamiento testigo (línea punteada) en función de los días desde antesis. Las líneas sobre el gráfico indican la duración del período de llenado hasta madurez fisiológica.	40
Fig. 2.9. Dinámica del porcentaje de humedad media diaria registrado en el tratamiento de alta temperatura durante el llenado (línea llena) y en el tratamiento testigo (línea punteada) en función de los días desde antesis.	40
Fig. 2.10. Dinámica del llenado de los aquenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante el llenado (cuadrados) y del tratamiento testigo (círculos). La flecha indica el momento de madurez comercial (MC) para ambos tratamientos. Las barras indican error estándar. La ecuación que corresponde a las rectas de ajuste para	

el tratamiento de alta temperatura y testigo es $y = 1.8x - 8.7$ ($R^2 = 0.95$); $y = 1.3x - 0.84$ ($R^2 = 0.93$), respectivamente.....	41
Fig. 2.11. Porcentaje de germinación a 25°C de los aquenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante el llenado (cuadrados) y del tratamiento testigo (círculos) en función de los días desde cosecha. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.	42
Fig. 2.12. Porcentaje de germinación a 11°C de los aquenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante el llenado (cuadrados) y del tratamiento testigo (círculos) en función de los días desde cosecha. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.	42
Fig. 2.13. Temperatura media diaria medida desde las 10 hs hasta las 18 hs, en función de los días desde anéxis para el tratamiento de alta temperatura durante la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos (13 a 26 DDA, línea llena, AT1) y durante la segunda etapa (27 a 46 DDA, línea punteada, AT2) (A), y durante ambas etapas (13 a 46 DDA, línea llena, AT1,2) y tratamiento testigo (línea punteada, T) (B).	44
Fig. 2.14. Dinámica del llenado de los aquenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos (13 a 26 DDA, AT1: Δ), durante la segunda etapa (27 a 46 DDA, AT2: ∇), ambas etapas (13 a 46 DDA, AT1,2: \square), y testigo (T: \circ). Las barras horizontales indican la ventana de aplicación de los tratamientos y la flecha vertical indica el momento de cosecha. Las barras verticales indican el error estándar. La ecuación que corresponde a las rectas de ajuste para los tratamientos AT1, AT2, AT1,2 y T son: $y = 1.3x - 1.8e^{-16}$ ($R^2 = 0.90$); $y = 2x - 9.7$ ($R^2 = 0.90$); $y = 1.4x - 0.18$ ($R^2 = 0.80$); $y = 1.8x - 3.6$ ($R^2 = 0.90$), respectivamente.	46
Fig. 2.15. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios cosechados de los tratamientos testigo (T), alta temperatura durante la primera etapa de aplicación de tratamientos térmicos (AT1), durante la segunda etapa (AT2) y durante ambas etapas (AT1,2) en función de los días desde cosecha. Las barras verticales indican error estándar.	47
Fig. 2.16. Porcentaje de germinación a 11°C, de aquenios (columnas vacías), semillas (columnas punteadas) y embriones (columnas llenas), en función de los días desde cosecha. Las barras verticales indican error estándar.	48
Fig. 2.17. Porcentaje de germinación a 11°C de incubación en función de los días desde cosecha, de aquenios (triángulos) y embriones (círculos) provenientes de la fecha de siembra temprana (símbolos oscuros) y tardía (símbolos claros). Las barras indican error estándar. Los valores entre paréntesis en la referencia indican la temperatura media de 10 a 18 hs para todo el período. Durante la post-cosecha, los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.	49
Fig. 2.18. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios (triángulos) y embriones (círculos), provenientes del ambiente de alta temperatura durante el llenado (símbolos oscuros), y del ambiente testigo de menor temperatura durante el llenado (símbolos claros), en función de los días desde cosecha. Las barras indican error estándar. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.	50
Fig. 2.19. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios, semillas y embriones provenientes de aquenios expuestos a alta temperatura durante el llenado (AT1,2, columnas negras) y al tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado (T, columnas rayadas). Las barras verticales indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.	50
Fig. 2.20. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios, semillas y embriones provenientes de aquenios expuestos a alta temperatura durante el llenado (AT1,2, columnas negras) y al tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado (T,	

columnas rayadas). Las barras verticales indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.	51
Fig. 2.21. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios a los 40 días post-cosecha, provenientes del ambiente de alta temperatura durante el llenado (AT1,2, columnas negras) y tratamiento testigo de menor temperatura (T, columnas rayadas), en agua, fluridone 100 uM (F), fluridone 100 uM + ABA 10 uM (F+ABA10) ó 50 uM (F+ABA50). Las barras verticales indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 5°C en seco.	52
Fig. 2.22: Representación esquemática del efecto del ambiente térmico materno sobre el nivel de dormición a cosecha, y su relación con el tipo de dormición predominante y la sensibilidad de los embriones al ABA.	56
Fig. 3.1. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 1 (tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado, ver exp. 2, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.	65
Fig. 3.2. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 2 (tratamiento de mayor temperatura durante el llenado, ver exp. 2, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.	65
Fig. 3.3. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 4 (fecha de siembra intermedia, ver exp. 1, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.	66
Fig. 3.4. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 3 (fecha de siembra temprana, ver exp. 1, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.	67
Fig. 3.5. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 5 (fecha de siembra tardía, ver exp. 1, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.	67
Fig. 3.6. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios (triángulos) y embriones (círculos) del lote 3 (fecha de siembra temprana, ver exp. 1, cap. 2), en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y a 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.	68
Fig. 3.7. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios (triángulos) y embriones (círculos) del lote 5 (ensayo de fecha de siembra tardía, ver exp. 1, cap. 2), en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y a 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.	68
Fig. 3.8. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios (triángulos) y embriones (círculos) del lote 1 (tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado, ver exp. 2, cap. 2), en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y a 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.	69
Fig. 3.9. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios (triángulos) y embriones (círculos) del lote 2 (tratamiento de mayor temperatura durante el llenado, ver exp. 2, cap. 2), en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y a 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.	69

Fig. 3.10. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios, semillas y embriones cosechados durante la campaña 2008-09 luego de ser almacenadas durante 30, 60 y 90 días a 5°C ó 25°C. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, para cada uno de los momentos desde cosecha evaluados. Las barras de error indican error estándar.	70
Fig. 3.11. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios, semillas y embriones cosechados durante la campaña 2009-10 luego de ser almacenadas durante 34, 57 y 70 días a 5°C ó 25°C. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, para cada uno de los momentos desde cosecha evaluados. Las barras de error indican error estándar.	71
Fig. 3.12. Porcentaje de la dormición observada en los aquenios incubados a 11°C explicada por dormición embrionaria, por dormición impuesta por la cubierta seminal verdadera o por dormición impuesta por pericarpio. Valores calculados en base a los porcentajes de germinación de aquenios, semillas y embriones de la Fig. 3.10. Las barras de error indican error estándar.	71
Fig. 3.13. Porcentaje de la dormición observada en los aquenios incubados a 11°C explicada por dormición embrionaria, por dormición impuesta por la cubierta seminal verdadera o por dormición impuesta por pericarpio. Valores calculados en base a los porcentajes de germinación de aquenios, semillas y embriones de la Fig. 3.11. Las barras de error indican error estándar.	72
Fig. 3.14. Dinámica de la germinación de aquenios en función de los días de incubación a 15°C previo a su almacenaje y luego de ser almacenados durante 18 días a 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C y 30°C. Las barras verticales indican error estándar.	73
Fig. 3.15. Porcentaje de germinación final de aquenios incubados a 15 °C previo a su almacenaje (Tpo. 0), y luego de ser almacenados durante 18 días a 5, 10, 15, 20, 25 ó 30°C. Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	73
Fig. 3.16. Días a 50% de germinación de aquenios incubados a 15°C previo a su almacenaje (Tpo. 0), y luego de ser almacenados durante 18 días a 5, 10, 15, 20, 25 ó 30°C. Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	74
Fig. 3.17. Porcentaje de germinación de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 25°C en agua, fluridone 100uM (F), fluridone 100uM+ABA10uM (F+A10), fluridone 100uM+ABA50uM (F+A50) y fluridone 100uM+ABA100uM (F+A100). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	75
Fig. 3.18. Porcentaje de germinación de semillas provenientes de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubadas a 11°C en agua, fluridone 100uM (F), fluridone 100uM+ABA10uM (F+A10), fluridone 100uM+ABA50uM (F+A50) y fluridone 100uM+ABA100uM (F+A100). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	76
Fig. 3.19. Porcentaje de germinación de embriones provenientes de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 11°C en agua, fluridone 100uM (F), fluridone 100uM+ABA10uM (F+A10), fluridone 100uM+ABA50uM (F+A50) y fluridone 100uM+ABA100uM (F+A100). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	76
Fig. 3.20. Porcentaje de germinación de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 25°C en agua, paclobutrazol 100uM (P) y paclobutrazol 100uM + GAs10uM (P+G10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	77

Fig. 3.21. Porcentaje de germinación de semillas provenientes de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubadas a 11°C en agua, paclobutrazol 100uM (P) y paclobutrazol 100uM + GA 10uM (P+G10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	78
Fig. 3.22. Porcentaje de germinación de embriones provenientes de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 11°C en agua, paclobutrazol 100uM (P) y paclobutrazol 100uM + GAs10uM (P+G10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	78
Fig. 3.23. Porcentaje de germinación de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 11°C en agua, NBD 100uM, NBD 100uM+etefón 0.1 ml/L (NBD+E1) y NBD 100uM+etefón 1 ml/L (NBD+E10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	79
Fig. 3.24. Porcentaje de germinación de embriones extraídos de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 11°C en agua, NBD 100uM, NBD 100uM+etefón 0.1 ml/L (NBD+E1) y NBD 100uM+etefón 1 ml/L (NBD+E10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	80
Fig. 3.25. Porcentaje final de germinación de aquenios y embriones luego de 20 días de incubación a 11°C (A) y contenido de ABA (pg/mg de peso seco) en embriones extraídos de aquenios almacenados a 5°C (columnas blancas) y 25°C (columnas negras) (B). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Las barras de error indican error estándar.	81
Fig. 3.26. Contenido de ABA (pg/mg de peso seco) en ejes embrionarios (A) y en cotiledones (B) extraídos de aquenios almacenados 5°C (columnas blancas) y 25°C (columnas negras) a las 0 y 24 hs de incubación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Las barras de error indican error estándar.	81
Fig. 3.27. Porcentaje final de germinación de aquenios y embriones luego de 20 días de incubación a 11°C (A) y contenido de ABA (pg/mg de peso seco) en embriones extraídos de aquenios almacenados a 5°C (símbolos blancos) y 25°C (símbolos negros) (B). Las barras de error indican error estándar.	82
Fig. 3.28. Contenido de ABA (pg/mg de peso seco) en ejes embrionarios (A) y en cotiledones (B) extraídos de aquenios almacenados 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos) a las 0, 15 y 24 hs de incubación. Las barras verticales indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	83
Fig. 3.29. Efecto del ambiente térmico de almacenaje sobre el nivel de dormición y su relación con el tipo de dormición predominante. Efecto de la síntesis, contenido y sensibilidad a ABA, su relación funcional con la sensibilidad a GAs, y el efecto del etileno en la determinación del nivel de dormición, en función del ambiente térmico de almacenaje.	89
Fig. 4.1. Modelo conceptual esquemático del control de la dormición en frutos de girasol, generado a partir de los datos obtenidos en esta tesis.	92

ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

AT1: alta temperatura durante la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos

AT2: alta temperatura durante la segunda etapa de aplicación de los tratamientos térmicos

AT1,2: alta temperatura durante ambas etapas de aplicación de los tratamientos térmicos

T: tratamiento térmico testigo

GAs: giberelinas

DDA: días desde antesis

RESUMEN

Efectos del ambiente térmico explorado durante la etapa de llenado y almacenaje sobre el nivel de dormición en frutos de girasol (*Helianthus annuus L.*)

A pesar de que la frecuente presencia de dormición en frutos de girasol (*Helianthus annuus*) suele dificultar las tareas de procesamiento y utilización de los mismos como semilla, existe escasa información en relación a la regulación ambiental de la dormición en frutos de esta especie. Entre los factores ambientales que actúan como reguladores de la dormición, la temperatura ha sido identificada como uno de los principales. En este contexto, el presente trabajo tuvo por objetivo principal estudiar el efecto del ambiente térmico durante las etapas de llenado y almacenaje post-cosecha sobre el nivel de dormición en frutos de girasol. Como objetivos secundarios, se evaluó el efecto de (1) las estructuras del fruto (embrión y cubiertas), (2) la sensibilidad de los frutos al ácido abscísico (ABA), giberelinas (GAs) y etileno y (3) los cambios en el contenido endógeno de ABA sobre la determinación del nivel de dormición y su relación con el ambiente térmico explorado por los frutos en ambas etapas. Mayores temperaturas durante el llenado determinaron mayores niveles de dormición a cosecha, que se asociaron a una mayor dormición impuesta por cubiertas y una mayor sensibilidad al ABA de los frutos. Mayores temperaturas durante el almacenaje post-cosecha (25°C) determinaron mayores tasas de salida de la dormición, que se asociaron a una menor dormición embrionaria, una menor sensibilidad al ABA, un menor contenido de endógeno ABA antes y durante la incubación, y una mayor sensibilidad a GAs de los frutos, sin diferencias en la sensibilidad a etileno. Los resultados obtenidos representan un aporte significativo para el diseño de estrategias de manejo, como fechas de siembra y condiciones de almacenaje que permitan disminuir los niveles de dormición en frutos de girasol. A su vez, la exploración de las bases fisiológicas de las respuestas observadas resulta relevante para la comprensión de los mecanismos que regulan la dormición en esta especie.

Palabras clave: ÁCIDO ABSCÍSICO - ALMACENAJE - CUBIERTAS SEMINALES - DORMICIÓN - EMBRIÓN - GIBERELINAS - GIRASOL - LLENADO DE GRANOS - PERICARPIO - TEMPERATURA

ABSTRACT

Effects of the thermal environment during grain filling and storage on the dormancy level of sunflower achenes (*Helianthus annuus L.*)

Although the frequent presence of dormancy in sunflower (*Helianthus annuus L.*) fruits usually prevents their prompt utilization by the seed industry, there is a lack of information regarding the environmental regulation of dormancy in fruits of this species. Within the environmental factors that regulate dormancy, temperature has been identified as one of the main ones. In this context, the principal aim of this study was to evaluate the effect of the thermal environment during grain filling and post-harvest storage on the dormancy level of sunflower achenes. As additional objectives, it was evaluated (1) the effect of the different fruit structures (embryo and seed coats), (2) the fruit sensitivity to abscisic acid (ABA), gibberellins (GAs) and ethylene, and (3) the changes in embryo ABA content in the determination of the level of dormancy and their relation with the thermal environment explored during both stages. Higher temperatures during grain filling determined higher levels of dormancy at harvest, which were associated with a higher coat imposed dormancy and a higher sensitivity to ABA. Higher temperatures (25°C) during post-harvest storage determined a faster dormancy release, which was associated with less embryo dormancy, less sensitivity to ABA and embryo ABA content before and during incubation, and a higher sensitivity to GAs, without differences in the sensitivity to ethylene. The obtained results represent a significant input for developing management practices, such as sowing dates and post-harvest storage conditions, to diminish dormancy levels in sunflower fruits. Furthermore, the exploration of the physiological basis of the observed responses is relevant for the comprehension of the mechanisms regulating dormancy in this species.

Key words: ABSCISIC ACID - DORMANCY - EMBRYO - GIBERELLINS - GRAIN FILLING - PERICARP - SEED ENVELOPES - STORAGE - SUNFLOWER - TEMPERATURE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

Planteo del problema y antecedentes

Desde un punto de vista ecológico, la presencia de dormición tiene un gran valor adaptativo para las especies silvestres, ya que determina la ocurrencia de la germinación bajo condiciones ambientales que asegurarán la perpetuación de la especie en un ambiente determinado (Karssen, 1982). Sin embargo, en especies de uso agrícola, la dormición es generalmente una característica indeseada, dado que impide la rápida utilización industrial del grano cosechado y/o su utilización como simiente (Benech-Arnold, *et al.*, 2013). En general, el mejoramiento ha disminuido la presencia de dormición en semillas de especies cultivadas. Sin embargo, en algunas especies esta disminución ha sido parcial, y de hecho, existen en el mercado genotipos que bajo determinadas circunstancias presentan niveles variables de dormición a cosecha. Este es el caso del cultivo de girasol (*Helianthus annuus*), donde las “semillas” (estrictamente, un fruto -aquenio) suelen presentar altos niveles de dormición a cosecha, y consecuentemente, muy bajos porcentajes de germinación (Corbineau, *et al.*, 1990; Benech-Arnold, *et al.*, 2013). Esta circunstancia representa un grave inconveniente para la producción de semilla híbrida para el mercado interno, y se torna aún más importante cuando se produce semilla para mercados en contra-estación. En ambos casos, las plantas procesadoras de semilla requieren la disponibilidad rápida de semilla “despierta” y en cantidades suficientes para justificar el comienzo de los procesos que incluyen la clasificación, el curado y finalmente el embolse de las partidas de semilla cosechada. Sin embargo, los altos niveles de dormición frecuentemente observados en la semilla de girasol con posterioridad a su cosecha impiden su rápida utilización industrial. Así, la dormición se constituye en un factor que incide directamente en los tiempos y costos de producción de semilla en este cultivo.

Los costos asociados a la dormición se generan en diferentes etapas del proceso de producción de semilla de girasol a nivel comercial. En relación a la etapa desde la cosecha hasta el procesamiento, existe un desfase que varía generalmente de uno a tres meses entre el momento en el que se concentra la cosecha de la mayor parte de los lotes, y el período en el que se registra la mayor producción de bolsas de semilla (Garello, comunicación personal). Durante este período, las partidas de semilla deben ser almacenadas por presentar altos niveles de dormición, y son frecuentes las “paradas” de planta por ausencia de material en condiciones de ser procesado. A su vez, en ciertas ocasiones, es necesario ingresar el mismo híbrido más de una vez al circuito de procesado por encontrarse las diferentes partidas de semilla con distintos niveles de dormición. Esta circunstancia aumenta considerablemente los costos y tiempos de procesamiento, ya que la planta debe ser limpiada exhaustivamente entre el procesado de cada híbrido. Finalmente, otros costos adicionales están asociados a la aplicación de programas de frío durante el almacenaje, los cuales son empleados como parte de las prácticas de rutina de algunas plantas procesadoras de girasol con el objetivo de disminuir los niveles de dormición de los materiales. Sin embargo, en relación a esta práctica, existe cierta controversia tanto en la industria como en la literatura, acerca de su efectividad en la disminución de los niveles de dormición en semillas de esta especie.

Numerosos trabajos efectuados en diversas especies han aportado evidencias de que las condiciones ambientales exploradas por las semillas, tanto durante su etapa de

llenado (*i.e.* etapa de desarrollo-maduración en la planta madre) como de post-cosecha, afectan su nivel de dormición (Fenner, 1991; Bianco, *et al.*, 1994; Seiler, 1998). Dentro de los factores ambientales que podrían afectar la dormición durante las etapas mencionadas, la temperatura ha sido señalada como uno de los principales (Batlla, 2004; Allen *et al.*, 2007). La producción de semilla de girasol en nuestro país, así como en las diferentes regiones de producción del mundo, tiene lugar en un amplio rango de ambientes térmicos. Sin embargo, no existen reportes basados en ensayos a campo que permitan establecer una asociación entre el ambiente térmico explorado durante la etapa de llenado y el nivel de dormición de las semillas a cosecha. Por otro lado, los resultados controversiales en relación al efecto de la temperatura durante la etapa de almacenaje post-cosecha sobre el nivel de dormición en semillas de esta especie, tampoco han permitido determinar cuáles serían las condiciones térmicas durante el almacenaje que permitirían disminuir en forma más eficiente el nivel de dormición de éstas luego de la cosecha.

El conocimiento de los efectos del ambiente térmico explorado por las semillas de girasol durante la etapa de llenado sobre el nivel de dormición a cosecha posibilitará el desarrollo de estrategias de manejo, como elección de fechas de siembra y zonas de producción, que minimicen la presencia de dormición en lotes de semilla híbrida de esta especie. A su vez, la posibilidad de determinar el efecto de la temperatura sobre los cambios en el nivel de dormición de las semillas durante el almacenaje permitirá desarrollar prácticas de manejo post-cosecha que aseguren una rápida salida de la dormición de los lotes cosechados. Estos conocimientos finalmente redundarán en un aporte para la disminución de los tiempos y costos asociados a la problemática de la dormición durante la producción de semilla híbrida de girasol a nivel comercial, permitiendo lograr un abastecimiento más rápido de semilla hacia los mercados interno y de contra-estación.

Dormición: definición y clasificación

La dormición puede ser definida como un atributo propio de la semilla que impide su germinación bajo condiciones hídricas, térmicas y gaseosas, que en otras circunstancias hubieran resultado adecuadas para su germinación (Benech-Arnold *et al.*, 2000). Esta definición implica que una vez removidas las “impedancias”, la germinación de las semillas podría tener lugar dentro de un amplio rango de condiciones ambientales (Batlla y Benech-Arnold, 2010). En este sentido, se trata de un atributo que define las condiciones del ambiente en las cuales la germinación podrá progresar. Este atributo es dinámico, y varía con el tiempo en un patrón que se encuentra modulado por las condiciones del ambiente, tanto durante la etapa de desarrollo-maduración de las semillas como durante la post-maduración (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

El nivel de dormición de una población de semillas puede variar dentro de una escala continua de niveles de dormición, entre un punto en el cual el rango de condiciones ambientales que permiten la germinación es nulo hasta un punto en el cual la amplitud de ese rango es máxima (Batlla *et al.*, 2004). A medida que las semillas disminuyen su nivel de la dormición, el rango de condiciones ambientales que permiten la germinación se amplía progresivamente. Lo contrario sucede cuando las semillas aumentan su nivel de dormición, viéndose reducidas las condiciones ambientales que permiten la germinación. Así, una semilla que se ha liberado completamente de la

dormición, tiene la capacidad de germinar en el rango más amplio de condiciones ambientales que le permite el genotipo (Baskin y Baskin, 2004). En este contexto, los cambios en el nivel de dormición de una población de semillas se pueden determinar a través de cambios en los rangos de condiciones del ambiente que permiten la germinación, por ejemplo, cambios en el rangos de temperaturas y/o de potenciales agua dentro de los cuales una población o lote de semilla es capaz de germinar (Batlla y Benech-Arnold, 2010).

Karssen (1982) sugirió que la dormición puede clasificarse en primaria y secundaria. La *dormición primaria*, hace referencia a la dormición que generalmente presentan las semillas recién dispersadas de la planta madre, mientras que la *dormición secundaria*, resulta de la re-inducción de la dormición en semillas ya dispersadas y que han previamente salido de la dormición primaria cuando las mismas perciben condiciones no favorables para la germinación. Otra clasificación de la dormición es aquella que se basa en la influencia de los diferentes tejidos o estructuras de la semilla y/o fruto en la determinación de la dormición. Así, la dormición puede clasificarse en impuesta por el embrión o impuesta por las cubiertas. La *dormición impuesta por el embrión* hace referencia a la imposibilidad del embrión de germinar aún si es aislado del resto de la estructura de la semilla. La *dormición impuesta por las cubiertas* se considera a aquella en la cual la semilla intacta no es capaz de germinar, mientras que el embrión es capaz de germinar si es aislado del resto de la estructura de la semilla y/o fruto (Allen *et al.*, 2007).

Efectos del ambiente térmico en la determinación del nivel de dormición

Las condiciones ambientales durante el llenado de los granos en la planta madre afectan el nivel de dormición de los mismos a cosecha (Fenner, 1991). Si bien se han reportado efectos de diferentes factores ambientales en la determinación del nivel de dormición, como por ejemplo la longitud del día, radiación, disponibilidad hídrica o disponibilidad de nutrientes, existe un fuerte consenso sobre el rol preponderante de la temperatura durante la etapa de llenado como modulador del nivel de dormición de las semillas a cosecha (Benech-Arnold, 2004; Batlla *et al.*, 2004). Generalmente, se ha observado que aumentos en la temperatura media durante la etapa de llenado de los granos se asocian a disminuciones en los niveles de dormición. Esta respuesta ha sido observada en un amplio rango de especies que no se encuentran relacionadas, como *Dactylis glomerata*, *Beta vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Lactuca sativa*, *Festuca arundinacea*, *Amaranthus retroflexus* y *Anagallis arvensis*, entre otras (Fenner, 1991). Sin embargo, ciertas especies parecen responder de manera opuesta, es decir, los ambientes más cálidos durante el llenado se asocian a aumentos en el nivel de dormición. Ejemplos de ello son las semillas de *Stylosanthes hamata* (Argel y Humphreys, 1983, citado por Fenner, 1991), así como las semillas de soja (Keigley y Mullen, 1986, citado por Fenner, 1991) y los frutos de quinoa (Ceccato *et al.*, 2011). Por ejemplo, en el cultivo de quinoa, se ha reportado para diferentes genotipos, que la exposición a temperaturas contrastantes durante la etapa de llenado de granos en la planta madre (logradas a través de diferentes fechas de siembra) se encuentra asociada a diferencias en el nivel de dormición, donde las mayores temperaturas durante esa etapa determinarían aumentos en el nivel de dormición de los frutos a cosecha (Ceccato *et al.*, 2011).

Respecto al cultivo de girasol, algunos trabajos efectuados en macetas bajo condiciones de invernáculo han reportado mayores niveles de dormición cuando las semillas fueron expuestas a ambientes más cálidos durante el llenado (Rodríguez *et al.*, 2003; Fonseca, 2000). Por ejemplo, Fonseca (2000) expuso plantas de girasol a diferentes temperaturas constantes dentro del rango 13°C - 36°C durante el período de llenado, observando que aquellos frutos expuestos a mayores temperaturas (31.6 y 35.7°C) presentaban menores porcentajes de germinación que aquellos expuestos a menores temperaturas, cuando los frutos eran incubados a bajas temperaturas (Fig. 1.1). Rodríguez *et al.* (2003) observaron un efecto similar al exponer a las plantas a temperaturas altas (35°C) durante todo el período de llenado de granos, no observando el mismo efecto cuando las plantas eran expuestas a períodos de alta temperatura de una semana. Sin embargo, en otros estudios en donde también se aplicaron distintas temperaturas durante el llenado, pero mediante el uso de cámaras de acrílico colocadas sobre las inflorescencias, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación final (Libenson, 1995).

Más allá de que los trabajos comentados previamente parecerían indicar la posibilidad de que la temperatura durante el llenado presente algún efecto en la determinación de los niveles de dormición a cosecha en semillas de girasol, al momento, no se conocen reportes que hayan evaluado la respuesta a la temperatura durante el llenado de granos en condiciones de campo, donde las plantas están expuestas a un ambiente térmico variable, y bajo las prácticas utilizadas actualmente en la producción de semilla híbrida a nivel comercial. La posibilidad de determinar los efectos del ambiente térmico durante esta etapa sobre el nivel de dormición sería de utilidad para la planificación de las siembras en fechas y zonas cuyo ambiente térmico durante el llenado se asocie a menores niveles de dormición a cosecha, permitiendo así una utilización más rápida de los lotes de semilla cosechados y adelantos en el momento de abastecimiento a los mercados internos o de contra-estación.

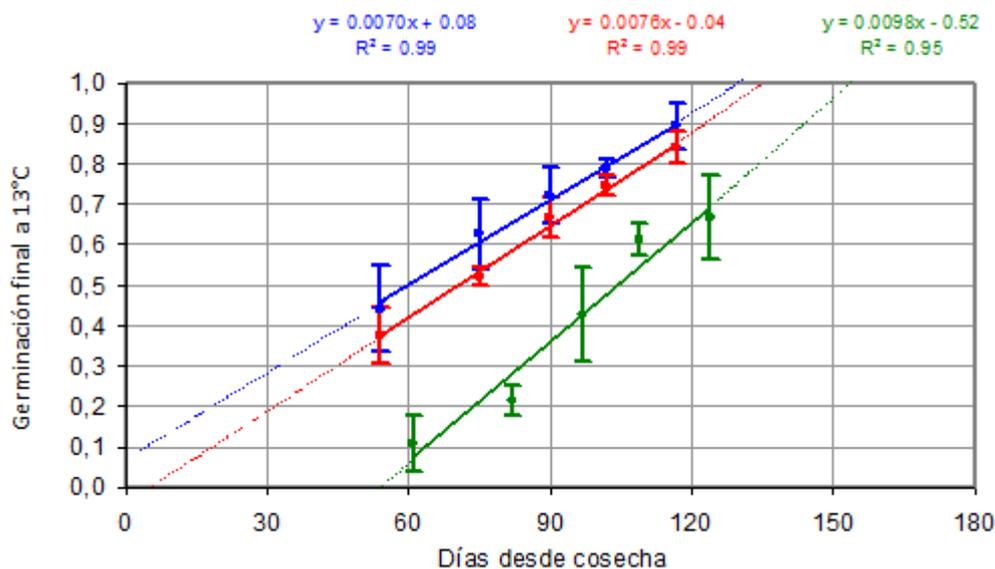


Fig. 1.1. Germinación final (proporción de la población evaluada) a 13°C de incubación, en función de los días desde la cosecha en frutos que desarrollaron a 24.4°C (azul), 26.1°C (rojo) y 31.6°C (verde). Las barras representan los errores estándar (Extraído de Fonseca, 2000).

En relación al ambiente térmico en la etapa de post-maduración (*i.e.* luego de la dispersión o cosecha), se ha observado que éste modula el patrón de salida de la

dormición en diversas especies, tanto cultivadas como silvestres. Por ejemplo, la exposición a bajas temperaturas en condiciones de humedad (o estratificación) es una práctica común utilizada para la ruptura de la dormición en varias especies forestales y hortícolas (Allen *et al.*, 2007). Otro ejemplo se encuentra en los bancos de semilla de algunas especies anuales primavero-estivales, en los que la exposición a bajas temperaturas durante el invierno conduce a la salida de la dormición primaria, mientras que los niveles de dormición vuelven a aumentar durante el verano por efecto de las altas temperaturas (Bowmeester y Karssen, 1992, 1993, citado por Allen *et al.*, 2007; Batlla y Benech-Arnold, 2010). El patrón de comportamiento opuesto lo presentan las especies anuales otoño-invernales, en las que las mayores temperaturas del verano determinan una disminución del nivel de dormición, mientras que las bajas temperaturas del invierno inducen a la entrada en dormición secundaria (Baskin y Baskin, 1976; Karssen, 1982; Probert, 1992, citados por Allen *et al.*, 2007). Otras especies en las que se ha documentado que las altas temperaturas luego de la dispersión o cosecha se asocian a una disminución del nivel de dormición son *Chenopodium album* (Karssen, 1970), quinoa (Ceccato, 2011), arroz (Roberts, 1962), *Dactylis glomerata* (Stoyanova y Kostov, 1983), *Festuca arundinacea* (Stoyanova *et al.*, 1984) y *Bromus tectorum* (Bauer *et al.*, 1998).

Respecto al cultivo de girasol, existe cierta controversia en la literatura en relación al efecto del ambiente térmico durante la etapa de post-cosecha sobre el nivel de dormición de los frutos. Por un lado, algunos autores han observado disminuciones en el nivel de dormición ante tratamientos con bajas temperaturas (Cseresnyes, 1979), mientras que otros han observado sólo ligeras disminuciones o directamente ningún efecto (Seiler, 1998; Brunick, 2007). Recientemente Bazin *et al.*, (2011) trabajando con embriones aislados de las cubiertas, reportaron la existencia de una interacción entre la temperatura de almacenaje y el contenido de humedad de los embriones, donde aumentos en la temperatura de almacenaje se asociaron a menores niveles de dormición sólo cuando los contenidos de humedad de la semilla fueron mayores (10 y 12%), mientras que con contenidos de humedad menores la respuesta fue contraria.

Los resultados comentados previamente muestran la falta de evidencias consistentes en relación al efecto de la temperatura sobre la tasa de salida de la dormición en frutos de girasol durante la etapa de almacenaje post-cosecha. La posibilidad de determinar el efecto de la temperatura sobre la salida de la dormición en esta etapa, resulta indispensable para el desarrollo de programas de almacenamiento que resulten más eficientes en relación a la disminución del nivel de dormición de la semilla cosechada.

Efectos de las estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición

La dormición impuesta por el embrión y la dormición impuesta por las cubiertas comparten una característica en común. En ambos casos, el embrión no es capaz de superar las impedancias impuestas a él; en el primer caso, por causas que ocurren en el mismo embrión, y en el segundo caso debido a los tejidos que lo rodean (Bewley y Black, 1994). La dormición impuesta por el embrión podría deberse a una inmadurez propia del embrión, o bien a la presencia de inhibidores en el mismo, mientras que la dormición impuesta por las cubiertas se asociaría a una restricción a la salida de inhibidores, a la entrada de agua o al intercambio gaseoso, a una restricción mecánica a

la expansión del embrión y/o a la presencia de inhibidores en las cubiertas (Bewley y Black, 1994).

En algunas especies, la dormición está impuesta sólo por el embrión o sólo por las cubiertas, mientras que en otras, ambos tipos de dormición pueden coexistir. El último, es el caso de algunas variedades de *Avena fatua* y *Hordeum* spp (Bewley y Black, 1994). En especies como *Lactuca sativa*, *Sinapsis arvensis* y *Acer pseudoplatanus*, la dormición es mayormente explicada por las cubiertas y los tejidos que rodean al embrión. Los tejidos que imponen la dormición en estas especies son el endosperma, la testa y el pericarpio respectivamente. En otras especies, como *Acer saccharum*, *Corylus avellana*, *Prunus persica*, entre otras citadas por Bewley y Black (1994), el embrión no es capaz de germinar, aún cuando es separado de los tejidos que lo rodean, por lo tanto, la estructura que impone la dormición en estas especies es el embrión.

La “semilla” de girasol es en realidad un fruto -aquenio o cipsela-, compuesto por el pericarpio, derivado de la pared del ovario, la cubierta seminal verdadera (o membrana de la semilla), y el embrión, que incluye el eje embrionario y los cotiledones (Knowles, 1978) (Fig. 1.2).



Fig. 1.2. Sección longitudinal de un aquenio de girasol. Extraído de Aguirrezábal y Pereyra (1998).

Durante la etapa de llenado y de post-cosecha, las semillas de girasol pueden presentar dormición impuesta por el embrión y/o dormición impuesta por las cubiertas (cubierta seminal verdadera y pericarpio) (Corbineau *et al.*, 1990; Brunick, 2007). En etapas tempranas del desarrollo (7 a 12 días post antesis), la dormición se encuentra principalmente impuesta por las cubiertas, ya que los embriones germinan fácilmente si son aislados de las mismas (Le Page-Degivry y Garello, 1992; Corbineau, *et al.*, 1990), mientras que los aquenios presentan altos niveles de dormición.

La dormición embrionaria, en cambio, aumenta progresivamente durante la etapa de llenado (a partir de los 12 días post antesis), explicando una mayor proporción de la dormición total (*i.e.* la dormición observada en los aquenios) (Fig. 1.3). Así, a los 20-22 días post antesis, los embriones presentan un alto nivel de dormición. Este alto nivel de dormición embrionaria comienza progresivamente a disminuir a medida que sigue avanzando el llenado o la maduración (Le Page-Degivry y Garello, 1992), mientras que la dormición por cubiertas permanece en niveles máximos (Fig. 1.3).

Cierto grado de dormición embrionaria persiste al momento en que los granos alcanzan la madurez de cosecha, de modo que la profunda dormición que los granos de girasol presentan a cosecha resulta de la coexistencia de dormición impuesta por sus cubiertas, más un remanente de la dormición embrionaria (Corbineau *et al.*, 1990). La dormición embrionaria en general se pierde rápidamente luego de la cosecha si las semillas son almacenadas en seco, mientras que la dormición impuesta por las cubiertas persiste por más tiempo, y puede requerir varios meses de almacenamiento en seco para revertirse (Benech-Arnold, 2004).

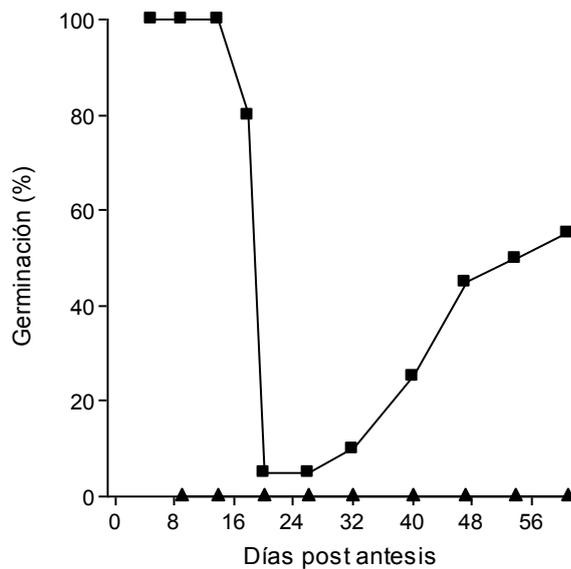


Fig. 1.3. Porcentaje de germinación de achenios (▲) y de embriones (■) cosechados a diferentes momentos post-antesis e incubados a 25°C (Extraído de Benech-Arnold, 2004, adaptado de Le Page-Degivry y Garello, 1992, y Corbineau *et al.*, 1990).

Más allá de las evidencias comentadas, que describen el efecto de las estructuras del fruto (embrión y cubiertas) sobre la determinación del nivel de dormición durante la etapa de llenado en girasol, existe escasa información acerca de la manera en que la dormición impuesta por el embrión y la dormición impuesta por las cubiertas (pericarpio y cubierta seminal verdadera) son reguladas por la temperatura explorada por el cultivo durante dicha etapa. Rodríguez *et al.* (2003), bajo condiciones de temperatura constante en invernáculo, han reportado que los mayores niveles de dormición observados en achenios de girasol como consecuencia de la exposición a mayores temperaturas durante el llenado se encontraron asociados a una mayor dormición impuesta por las cubiertas, ya que los embriones aislados de las mismas presentaron bajos niveles de dormición para cualquiera de las temperaturas evaluadas. Por otro lado, y respecto a la etapa de post-cosecha, tampoco se conoce cuáles son los efectos relativos de las distintas estructuras del fruto sobre el patrón de salida de la dormición, así como tampoco, de qué manera el ambiente térmico regula ambos tipos de dormición durante esta etapa. Conocer el rol ejercido por las diferentes estructuras del fruto (embrión, pericarpio y cubierta seminal verdadera) en la determinación del nivel de dormición en relación al ambiente térmico explorado durante el llenado y el almacenaje, resultará de relevancia para la comprensión de los posibles mecanismos a través de los cuales la temperatura afecta la dormición en los frutos de girasol.

Control hormonal de la dormición: efecto del ácido abscísico y las giberelinas

Los efectos de las señales ambientales sobre el nivel de dormición en semillas de un gran número de especies se encuentran mediados, al menos en parte, por hormonas

vegetales (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). El ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GAs) han sido identificadas como potenciales reguladores de los niveles de dormición en semillas de numerosas especies (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein *et al.*, 2008). Estudios moleculares y fisiológicos han correlacionado cambios en los niveles de estas hormonas y/o en la sensibilidad de las semillas a estas hormonas con diferentes grados de dormición, que van desde una profunda dormición primaria o secundaria, hasta niveles de dormición casi nulos (Finkelstein *et al.*, 2008).

El ABA ha sido identificado como un regulador positivo de la inducción y del mantenimiento de la dormición (Bewley, 1997). Una gran parte de la evidencia surge de trabajos efectuados con mutantes de diferentes especies. Por ejemplo, diversos experimentos efectuados con mutantes de *Arabidopsis*, maíz y tomate deficientes en el contenido de ABA o insensibles a la hormona, han confirmado la hipótesis de que la ausencia o la insensibilidad al ABA resulta en semillas que presentan germinación precoz o viviparismo (Bewley, 1997). Otras evidencias surgen, por ejemplo, de trabajos en los cuales la aplicación de inhibidores de la síntesis de ABA durante la etapa de desarrollo de las semillas de varias especies, resulta en una anticipación de la liberación de la dormición (Xu *et al.*, 1990; Steinbach *et al.*, 1997, citados por Benech-Arnold, 2004), incluyendo a embriones en desarrollo de girasol (Le Page-Degivry, *et al.*, 1990).

Las GAs parecen actuar en forma antagónica al ABA, ya que promueven la germinación. Aunque la acumulación de GAs se asocia comúnmente con la liberación de la dormición y/o la promoción de la germinación, el rol de las GAs en la regulación del nivel de dormición en semillas es controversial (Finkelstein *et al.*, 2008). Varios autores han reportado que tratamientos sólo con GAs no han logrado estimular la germinación en semillas dormidas de varias especies, incluyendo *Arabidopsis* (Derks *et al.*, 1994; Bewley, 1997; Ali-Rachedi *et al.*, 2004), y observaron que sería necesaria una disminución en los niveles de ABA previo a que los niveles de GAs y/o la sensibilidad a GAs aumenten.

Dado que en muchas especies no se ha encontrado una correlación entre el contenido endógeno de hormonas en las semillas y los niveles de dormición, discusiones iniciadas por Trewavas (1982) han resultado en una mayor relevancia del rol jugado por la sensibilidad de los tejidos a las hormonas. Por ejemplo, en girasol, Le Page-Degivry *et al.* (1996) han encontrado que los embriones de esta especie pierden la sensibilidad al ABA a medida que disminuyen sus niveles de dormición durante la post-maduración. Asimismo, y en cuanto a la sensibilidad a GAs, los mismos autores han observado que a medida que disminuye el nivel de dormición de los embriones por efecto de diferentes tratamientos, la aplicación de GAs externas es progresivamente más efectiva en la promoción de la germinación, mostrando así aumentos en la sensibilidad a GAs.

Otra hormona que se reportó que puede estar implicada en la regulación de la dormición en ciertas especies es el etileno. Éste promovería la terminación de la dormición a través de la atenuación de la señalización del ABA y de los niveles de ABA (Finkelstein *et al.* 2008). En girasol, Corbineau *et al.* (1990) reportaron que la aplicación exógena de etileno estimuló la germinación de aquenios y embriones inmaduros con altos niveles de dormición. Además, encontraron que varios inhibidores de la biosíntesis o de la acción de etileno inhibieron marcadamente la germinación de embriones que no presentaban dormición.

Más allá de los resultados comentados en relación a la regulación hormonal de la dormición en los frutos de girasol, no se sabe aún si los posibles efectos del ambiente térmico durante las etapas de llenado y post-cosecha en la determinación del nivel de dormición se encuentran asociados a cambios en la sensibilidad a estas hormonas por parte de los frutos. Comprender este tipo de asociaciones aportará conocimiento respecto a los mecanismos fisiológicos a través de los cuales la temperatura regularía los cambios en el nivel de dormición en esta especie.

Sobre la base de lo expuesto hasta aquí, podemos concluir que la falta de un conocimiento acabado acerca de cómo el ambiente térmico explorado por los frutos durante el llenado en condiciones de cultivo y el almacenaje luego de la cosecha regula la dormición en girasol, conspira contra la posibilidad de diseñar estrategias de manejo exitosas que permitan minimizar las problemáticas de presencia de altos niveles de dormición en los frutos de girasol a cosecha, e identificar condiciones térmicas de almacenaje que permitan disminuir los niveles de dormición durante la post-cosecha. Entender cómo la temperatura regula la dormición en frutos de girasol, no sólo posibilitará diseñar las estrategias mencionadas a nivel productivo, sino que a su vez, resultará relevante en la comprensión de los mecanismos que regulan la dormición en esta especie.

Objetivos del proyecto

Objetivo General:

La presente tesis tiene como objetivo general *estudiar el efecto del ambiente térmico explorado durante la etapa de llenado y almacenaje post-cosecha sobre el nivel de dormición en frutos de girasol.*

Objetivos Particulares:

1. Estudiar el efecto del ambiente térmico explorado por los frutos de girasol durante la etapa de llenado sobre el nivel de dormición a cosecha bajo condiciones de cultivo a campo.
2. Estudiar el efecto de la temperatura de almacenaje en post-cosecha sobre los cambios en el nivel de dormición en frutos de girasol.
3. Estudiar el aporte relativo de las diferentes estructuras del fruto de girasol (pericarpio, cubierta seminal y embrión) en la determinación del nivel de dormición de los aquenios a cosecha y durante el almacenaje post-cosecha, y su relación con el ambiente térmico explorado por los frutos durante las etapas de llenado y almacenaje.
4. Determinar, en forma preliminar, en qué medida los efectos observados en 1. están asociados a diferencias en la sensibilidad de los frutos al ABA.
5. Determinar, en forma preliminar, en qué medida los efectos observados en 2. están mediados por cambios (a) en la sensibilidad de los frutos al ABA, las GAs y el etileno, y (b) en el contenido de ABA en los embriones antes y durante la incubación.

Hipótesis

1. El ambiente térmico explorado durante la etapa de llenado afecta el nivel de dormición de los frutos de girasol a cosecha. Mayores temperaturas experimentadas por los frutos durante la etapa de llenado determinan un mayor nivel de dormición a cosecha.
2. La temperatura explorada durante el almacenaje post-cosecha afecta el nivel de dormición de los frutos de girasol. Mayores temperaturas de almacenaje ($>20^{\circ}\text{C}$) retrasan la salida de la dormición de los frutos en comparación con lo observado a menores temperaturas ($<10^{\circ}\text{C}$).
3. Frutos de girasol expuestos a ambientes térmicos durante la etapa de llenado que determinan un mayor nivel de dormición a cosecha presentan una mayor proporción de la dormición explicada por las cubiertas, en comparación con lo observado en frutos expuestos a ambientes térmicos durante el llenado que determinan un menor nivel de dormición a cosecha.
4. El mayor nivel de dormición que presentan los frutos de girasol expuestos a temperaturas que retrasan la salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha se asocia a una mayor sensibilidad al ABA, en comparación con lo observado en frutos expuestos a temperaturas que adelantan la salida de la dormición durante el almacenaje.
5. El mayor nivel de dormición que presentan los frutos de girasol expuestos a temperaturas que retrasan la salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha se asocia a una menor sensibilidad a la GAs, en comparación con lo observado en frutos expuestos a temperaturas que adelantan la salida de la dormición durante el almacenaje.

Estructura de la tesis

La presente tesis se estructura en cuatro capítulos. Con el propósito de cumplir con los objetivos propuestos, los resultados de este trabajo se presentan en los capítulos 2 y 3. En cada uno de ellos, se presenta una introducción al tema, los objetivos particulares, la metodología utilizada, y se discuten los resultados obtenidos. En el capítulo 2, se describen los resultados relacionados al efecto del ambiente térmico explorado por los frutos durante la etapa de llenado en la determinación del nivel de dormición a cosecha, y su relación con los efectos de las estructuras del fruto (i.e., pericarpio, cubierta seminal verdadera y embrión) y la sensibilidad de los frutos al ABA. En el capítulo 3, se describen los resultados relacionados al efecto del ambiente térmico durante la etapa de almacenaje post-cosecha en el patrón de salida de la dormición, y su relación con los efectos de las estructuras del fruto, la sensibilidad de los frutos a ABA, GAs y etileno, y el contenido endógeno de ABA en los embriones antes y durante la incubación. Finalmente, el capítulo 4 comprende la discusión general y conclusiones de los resultados obtenidos en esta tesis.

CAPÍTULO 2

EFFECTOS DEL AMBIENTE TÉRMICO EXPLORADO DURANTE LA ETAPA DE LLENADO SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN EN FRUTOS DE GIRASOL

CAPÍTULO 2: EFECTOS DEL AMBIENTE TÉRMICO EXPLORADO DURANTE LA ETAPA DE LLENADO SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN EN FRUTOS DE GIRASOL

Introducción

Trabajos efectuados en numerosas especies han demostrado que la temperatura explorada por las semillas durante su desarrollo y maduración en la planta madre (i.e. llenado de granos) afecta el nivel de dormición de las mismas a cosecha (Fenner, 1991). En general, se ha observado que aumentos en la temperatura media diaria durante el llenado se asociarían a disminuciones en los niveles de dormición. Ejemplos de este tipo de respuesta fueron reportados para semillas de *Dactylis glomerata*, *Beta vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Lactuca sativa*, *Festuca arundinacea*, *Amaranthus retroflexus* y *Anagallis arvensis*, entre otras (Fenner, 1991). Sin embargo, ciertas especies, como *Stylosanthes hamata* (Argel y Humphreys, 1983, citado por Fenner, 1991), y *Glycine max* (Keigley y Mullen, 1986, citado por Fenner, 1991) parecerían responder de manera opuesta. En estas especies, se han observado aumentos en los niveles de dormición cuando las semillas han sido expuestas a mayores temperaturas durante el llenado.

En relación al girasol, algunos trabajos efectuados bajo regímenes de temperaturas constantes en condiciones controladas (invernáculos) sugerirían que éste presentaría una respuesta similar a *S. hamata* y *G. max*, es decir, mayores temperaturas durante el llenado se asociarían con mayores niveles de dormición de los frutos. Por ejemplo, Rodríguez *et al.* (2003) colocaron plantas de girasol en invernáculo bajo dos temperaturas constantes (25°C ó 35°C) desde anthesis hasta los 40 días post-thesis con el objetivo de evaluar el efecto de altas temperaturas durante el llenado sobre el nivel de dormición. La exposición de las plantas al tratamiento de mayor temperatura resultó en mayores niveles de dormición de los frutos, observándose una reducción en el porcentaje de germinación de cerca del 60% en aquellos provenientes del tratamiento de mayor temperatura durante el llenado en relación al tratamiento de menor temperatura. Respuestas similares fueron reportadas por Fonseca (2000). Sin embargo, períodos semanales de alta temperatura (35° C) en distintos momentos del llenado, no se asociaron a diferencias en el nivel de dormición resultante (Rodríguez *et al.*, 2003). Por otro lado, Libenson (1995) luego de exponer capítulos de girasol a dos ambientes térmicos que diferían en aproximadamente 8°C mediante el uso de cámaras de acrílico colocados en la inflorescencia, no observó diferencias en los porcentajes de germinación obtenidos, sino sólo diferencias en la tasa de germinación durante las primeras horas de incubación.

Si bien existen algunos reportes como los comentados anteriormente, en los que se evaluó el efecto de la temperatura durante el llenado sobre el nivel de dormición en girasol, estos trabajos presentan la limitación de haber evaluado el efecto de la temperatura sobre plantas creciendo en macetas dentro de invernáculos o cámaras, y bajo regímenes térmicos prácticamente constantes. Por lo tanto, aún se requiere estudiar la magnitud de los efectos en condiciones más representativas de un cultivo a campo, donde las plantas se encuentran expuestas a un ambiente térmico variable.

Las distintas estructuras que componen al fruto de girasol ejercen efectos diferenciales en la imposición de la dormición según la etapa de desarrollo-maduración o estado fisiológico en que se encuentran los frutos. Por ejemplo, en etapas tempranas

del desarrollo de los frutos, la dormición se encuentra principalmente impuesta por las cubiertas, ya que los embriones germinan fácilmente si son aislados de ellas (Corbineau *et al.*, 1990; Le Page-Degivry y Garello, 1992). A medida que el desarrollo progresa, los embriones comienzan a aumentar sus niveles de dormición hasta cerca de los 20-22 días post-antesis, momento a partir del cual estos niveles de dormición comienzan a disminuir. A cosecha, los embriones presentan bajos niveles de dormición, mientras que en los frutos completos, los niveles de dormición son generalmente elevados. Esto se debe a que cerca de madurez de cosecha predomina la dormición impuesta por las cubiertas, que persiste por algún tiempo, y puede requerir varias semanas o meses de almacenamiento en seco para disminuir (Corbineau *et al.*, 1990; Bianco *et al.*, 1994).

Si bien al presente se encuentran disponibles varios reportes en la literatura acerca del efecto de las estructuras de la semilla en la determinación del nivel de dormición durante la etapa de llenado en girasol, aún existe escasa información acerca de qué manera el ambiente térmico, uno de los principales reguladores del nivel de dormición en numerosas especies, modula ambos tipos de dormición (impuesta por el embrión o por las cubiertas). No obstante, algunos antecedentes indican que los mayores niveles de dormición observados ante ambientes de mayor temperatura durante el llenado se explicarían por una mayor dormición impuesta por las cubiertas, ya que los embriones aislados de las mismas presentarían bajos niveles de dormición cuando los mismos son dispuestos a germinar a 10 °C (Rodríguez *et al.*, 2003).

Las hormonas vegetales ejercen un importante rol en la regulación del nivel de dormición de las semillas. Existe considerable evidencia que indica que la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) es un regulador positivo tanto de la inducción como del mantenimiento de la dormición (Bewley, 1997; Benech-Arnold, 2004). Se ha demostrado que, en general, la transición desde un estado de dormición a un estado de liberación de la dormición es acompañada por una disminución en la sensibilidad a ABA (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La sensibilidad a ABA por parte de las semillas puede variar según las condiciones ambientales exploradas por éstas durante la etapa de llenado. Ejemplos de este tipo de respuesta han sido reportados para *Sorghum bicolor*, en el que ciertas condiciones del ambiente, como por ejemplo la disponibilidad de agua y de nutrientes durante la etapa de llenado de los frutos en la planta madre, se asociaron a cambios en la sensibilidad a ABA, y en consecuencia, a los niveles de dormición resultantes (Benech-Arnold *et al.*, 1991, 1995a). En el cultivo de girasol, aún se desconoce si los efectos de las condiciones del ambiente durante la etapa de llenado sobre el nivel de dormición se encuentran mediados por diferencias en la sensibilidad a ABA. En este contexto, cobra relevancia evaluar si la temperatura imperante durante el llenado de los frutos, modularía el nivel de dormición a cosecha mediante cambios en la sensibilidad a esta hormona.

En base a lo expuesto, los objetivos del presente capítulo fueron:

1. Estudiar el efecto del ambiente térmico explorado por los frutos de girasol durante la etapa de llenado sobre el nivel de dormición a cosecha bajo condiciones del cultivo a campo.
2. Estudiar el aporte relativo de las diferentes estructuras del fruto de girasol (pericarpio, cubierta seminal y embrión) en la determinación del nivel de dormición de

los aquenios a cosecha y su relación con el ambiente térmico explorado por los frutos durante la etapa de llenado.

3. Determinar, en forma preliminar, en qué medida los efectos observados en 1. están asociados a diferencias en la sensibilidad de los frutos al ABA.

Materiales y métodos

Sitio de los ensayos y material vegetal

Tres experimentos se llevaron a cabo en la localidad de Fontezuela (S33°53'28.9" W060°27'27.7"), partido de Pergamino, provincia de Buenos Aires, durante las campañas 2008-09 y 2009-10. En todos los experimentos se utilizaron líneas parentales y mediante polinización abierta se produjo semilla del híbrido DK4045 (Fig. 2.1). Este híbrido se seleccionó por presentar altos niveles de dormición a cosecha.



Fig. 2.1. Parentales del híbrido DK4045 utilizados en los experimentos (A y B). Aquenio liso de una planta del híbrido DK4045 en estadio fenológico R5.5 (Schneiter y Miller, 1981) (C).

Generación de ambientes térmicos diferenciales durante la etapa de llenado y su relación con el nivel de dormición (Objetivo 1).

Experimento 1: Exposición de los frutos a diferentes ambientes térmicos durante la etapa de llenado mediante variaciones en la fecha de siembra, y su relación con el nivel de dormición a cosecha.

Durante la campaña 2008-2009, los parentales del híbrido DK4045 fueron sembrados a campo en tres fechas de siembra (22/09/08, 22/10/08 y 02/12/08) y en cuatro repeticiones. Las fechas fueron elegidas de modo de exponer a los frutos a diferentes ambientes térmicos durante su etapa de llenado.

Experimentos 2 y 3: Exposición de los frutos a diferentes ambientes térmicos durante la etapa de llenado mediante el uso de carpas, y su relación con el nivel de dormición a cosecha.

Experimento 2: Durante la campaña 2008-2009 (fecha de siembra 23/10/2008), se generaron ambientes térmicos diferenciales durante el llenado mediante la implementación de carpas de polietileno. En el experimento se establecieron dos tratamientos: i) alta temperatura durante todo el período de llenado, y ii) tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado. El diseño del experimento fue completamente aleatorizado con cuatro repeticiones, considerando como repetición a las plantas provenientes de cada carpa individual.

Experimento 3: Durante la campaña 2009-2010 (fecha de siembra 08/10/2009), se generaron cuatro ambientes térmicos diferenciales: i) alta temperatura desde los 13 a los 46 días desde anthesis (DDA), ii) alta temperatura desde los 13 a los 26 DDA, iii) alta temperatura desde los 27 a los 46 DDA, y iv) testigo de menor temperatura. El diseño utilizado fue completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones, considerando como repetición a las plantas provenientes de cada carpa individual.

Condiciones generales de los ensayos y variables registradas

En los tres experimentos las líneas parentales fueron sembradas a una densidad de 7,14 plantas/m² y en surcos separados a 0.7 m, intercalando un surco de parental masculino cada dos surcos del parental femenino. La fecha de floración se determinó cuando el 50% de los capítulos presentó al menos un surco de flores abiertas. En los experimentos de generación de ambientes térmicos diferenciales mediante el uso de carpas de polietileno, el comienzo de los tratamientos se estableció a los 12-13 días luego de la fecha de floración para evitar que las altas temperaturas provocaran el aborto de flores y/o granos recién fecundados. Una vez transcurridos los 12-13 días desde floración, se colocó una carpa de polietileno de 100 micrones de espesor, de 4 m² de superficie y 2 m de altura, sobre cada una de las parcelas a la que se les asignó aleatoriamente los tratamientos de alta temperatura (Fig. 2.2). Estas carpas permanecieron colocadas sobre cada parcela permitiendo la apertura en la parte inferior y cenital hasta el final de cada tratamiento. Durante el período de aplicación de los tratamientos, y con el objetivo de evitar la acumulación de humedad y gases (CO₂) durante el día y la noche, las carpas eran abiertas diariamente durante 1 hora, desde las 8 hs hasta las 9 hs cada mañana; el techo y los laterales eran parcialmente abiertos desde

las 12 hs hasta las 16 hs (excepto en los días de bajas temperaturas); las juntas del techo con los laterales mantenían pequeñas hendiduras de ventilación, y los plásticos laterales de las carpas se mantenían elevados 30 cm por sobre la superficie del suelo. Estas prácticas, más las características estructurales de las carpas, fueron implementadas con el objetivo de permitir el intercambio gaseoso con el exterior.

En las parcelas asignadas a los tratamientos de alta temperatura, las carpas permanecieron colocadas sobre las plantas durante todo el período de llenado a evaluar, y en el período de llenado que no correspondiera al de evaluación, fueron cubiertas sólo por techos de polietileno con una cobertura lateral superior. Las parcelas asignadas al tratamiento testigo (Fig. 2.2) permanecieron cubiertas bajo los techos de polietileno durante todo el período de llenado.

Con el objetivo de determinar el momento de madurez fisiológica, a partir de la fecha de primera antesis y cada cinco días (Experimentos 1 y 2) ó tres días (Experimento 3), se tomaron muestras de 20 granos por cada tratamiento y repetición que fueron pesados, colocados en estufa a 80°C por 72 hs. y pesados nuevamente para determinar peso seco y contenido de humedad. Este procedimiento se repitió hasta observarse al menos tres momentos de muestreo con valores similares de peso seco, indicando el cese de acumulación de materia seca por parte de los frutos. Una vez alcanzado este momento, tanto las carpas como los techos fueron retirados de los experimentos.

El momento de cosecha se determinó de manera similar al utilizado durante la producción de híbridos comerciales (i.e. cuando la humedad de los granos fue menor al 11%). En dicho momento, los capítulos se separaron de las plantas madre utilizando tijeras de poda y se efectuó el desgrane en forma manual. Cada capítulo fue dividido en tres regiones concéntricas y sólo se utilizaron para las pruebas de germinación los granos provenientes del tercio intermedio, mientras que los ubicados en el tercio más periférico y en el tercio central fueron descartados. Se consolidó un lote de semillas de cada tratamiento y repetición con granos provenientes de plantas que no hubiesen diferido en más de dos días en su fecha de primera antesis, de manera de contar con la cantidad de semilla necesaria para realizar los ensayos de germinación planificados. Cada lote de semillas fue luego colocado en una bolsa de red y secado a 40°C hasta llegar a una humedad del 6%, copiando el procedimiento de secado post-cosecha que se efectúa en la producción de semilla híbrida comercial. Luego del secado, las muestras provenientes de los diferentes tratamientos fueron sometidas a las pruebas de germinación (ver apartado “Pruebas de germinación”), que fueron efectuadas a cosecha y repetidas cada 15 días luego de cosecha a 11°C y 25°C de incubación (experimentos 1 y 2), o a los 12 días desde cosecha y repetidas cada 20 días luego de cosecha a 25°C de incubación (experimento 3), en un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones de 25 aquenios (experimentos 1 y 2) ó 20 aquenios (experimento 3) cada una.

Durante todo el ciclo del cultivo se registró la temperatura, radiación incidente y precipitaciones diarias con una estación meteorológica (I-Metos. Pessl Instruments, Austria) ubicada a 200 metros de las parcelas experimentales. En los experimentos 2 y 3, en cada carpa se registró la temperatura y la humedad en forma horaria mediante el uso de dataloggers (Hobo U10) colocados dentro de tubos de PVC a la altura de los capítulos. A su vez, se midieron los niveles de radiación dentro y fuera de las carpas

mediante un radiómetro (Cavadevices). Los experimentos fueron conducidos sin limitaciones hídricas, y libres de malezas, enfermedades e insectos, para lo cual se realizaron desmalezados manuales y se aplicaron fungicidas e insecticidas cuando fue necesario.



Fig. 2.2. Carpas utilizadas en los tratamientos de alta temperatura (izquierda) y techos utilizados en el tratamiento control de menor temperatura (derecha).

Evaluación del efecto de las diferentes estructuras del fruto de girasol en la determinación del nivel de dormición a cosecha, y su relación con el ambiente térmico explorado por los frutos durante la etapa de llenado (Objetivo 2).

Experimento 1.1: con el objetivo de evaluar el efecto de las diferentes estructuras del fruto (pericarpio, cubierta seminal verdadera y embrión) en la determinación del nivel de dormición, se efectuaron pruebas de germinación de aquenios (fruto completo), semillas (embrión manteniendo la cubierta seminal verdadera, pero habiendo removido el pericarpio) y embriones (habiendo removido tanto la cubierta seminal verdadera como el pericarpio) (Fig. 2.3). Las pruebas de germinación fueron realizadas en forma quincenal (desde los 15 hasta los 90 días post-cosecha) con frutos provenientes del ensayo de la fecha de siembra temprana del Experimento 1.

Experimento 1.2: con el objetivo de evaluar el efecto de las estructuras del fruto y su relación con el ambiente térmico explorado durante el llenado, se efectuaron pruebas de germinación de aquenios y embriones provenientes de la fecha de siembra temprana (22/09/08) y tardía (02/12/08) del Experimento 1, y de los ambientes térmicos diferenciales (alta temperatura durante todo el llenado vs. control) generados mediante la implementación de carpas de los Experimentos 2 y 3. Se efectuaron pruebas de germinación de semillas sólo en el Experimento 3.

La dormición impuesta por el pericarpio fue estimada a partir de la diferencia observada entre el porcentaje de aquenios no germinados (i.e. dormidos) (fruto completo) y el porcentaje de semillas no germinadas (habiendo removido el pericarpio). La dormición impuesta por la cubierta seminal verdadera fue estimada a partir de la diferencia entre el porcentaje de semillas no germinadas y el porcentaje de embriones no germinados (habiendo removido la cubierta seminal verdadera y el pericarpio). La dormición embrionaria fue estimada a partir del porcentaje de embriones no germinados.

Las pruebas de germinación fueron realizadas a cosecha y/o durante la post-cosecha a 11°C (exp. 1.1 y 1.2) y a 25°C (exp. 1.2) de incubación, en un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones de 25 aquenios, semillas o embriones, según corresponda. Desde el momento de cosecha hasta el momento de las pruebas de germinación transcurrieron de uno a cinco días; durante este período la semilla fue mantenida en una cámara a 22°C en oscuridad.

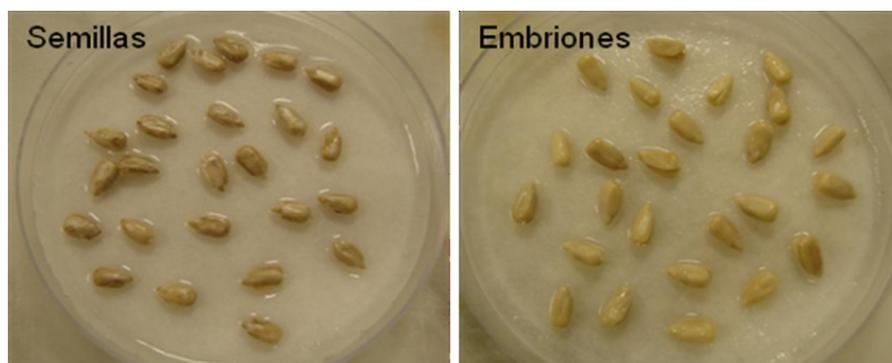


Fig. 2.3. Cajas de Petri con muestras de semillas (*i.e.* embriones con cubierta seminal verdadera) (izquierda), y embriones desnudos (derecha).

Evaluación de la sensibilidad al ABA en función del ambiente térmico explorado por los frutos durante el llenado y su relación con el nivel de dormición a cosecha (Objetivo 3).

Con el objetivo de evaluar si los efectos del ambiente térmico durante el llenado en la determinación del nivel de dormición se encontrarían relacionados a diferencias en la sensibilidad al ABA de los frutos, tres repeticiones de 20 aquenios cada una, provenientes de los tratamientos de alta temperatura durante todo el llenado y tratamiento control del Experimento 3, fueron sometidas a un test de germinación a cosecha bajo los siguientes medios de incubación:

1. Agua destilada
2. Agua destilada + Fluridone 100 uM
3. Agua destilada + Fluridone 100 uM + ABA 10 uM
4. Agua destilada + Fluridone 100 uM + ABA 50 uM

El fluridone es un inhibidor de la síntesis de ABA. La inclusión de este compuesto en el medio de incubación tuvo como objetivos: i. evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis *de novo* de ABA (tratamiento 2) y ii. evitar la síntesis de esta hormona durante el período de incubación, de manera de evaluar sólo la sensibilidad al ABA agregado en forma exógena (tratamientos 3 y 4).

Desde la cosecha hasta el inicio de la incubación, transcurrieron 40 días, durante los cuales los lotes de semilla fueron mantenidos a 5°C en oscuridad. La metodología utilizada en las pruebas de germinación se detalla en el apartado “Pruebas de germinación”.

Pruebas de germinación

Los aquenios, semillas y/o embriones (según corresponda) fueron colocados en cajas de Petri de 9 cm de diámetro sobre dos discos de papel de filtro conteniendo 5 ml de agua destilada o los medios de incubación detallados previamente. En los tratamientos en los que se removió el pericarpio, el mismo fue cortado en la región micropilar, cortando sólo el pericarpio y evitando dañar el embrión. En los tratamientos en los que se removió además la cubierta seminal verdadera, las semillas (el fruto sin el pericarpio) fueron colocadas durante dos horas en cajas de Petri sobre un disco de papel filtro conteniendo 3 ml de agua destilada o los medios de incubación detallados previamente, con el objetivo de hidratar la cubierta seminal verdadera previo a su separación del embrión, evitando así dañarlo.

Las cajas conteniendo los aquenios fueron incubadas a las temperaturas de 11°C y 25°C, mientras que las cajas conteniendo las semillas y los embriones fueron incubadas sólo a 11°C debido a que en ensayos preliminares se observó que a 25°C la germinación de las semillas y de los embriones era muy rápida y no permitía observar diferencias entre tratamientos. Todas las cajas se mantuvieron en cámaras con una variación de temperatura de ± 1 °C por un lapso de 20 días. A los 20 días desde el comienzo de la incubación se efectuó un recuento de germinación, siendo la visualización de la protrusión de la radícula el criterio para determinar la germinación de los aquenios, y la visualización de la elongación de la radícula por 3 mm el criterio para determinar la germinación de las semillas y embriones. Todos los aquenios, semillas y embriones que durante la incubación presentaron síntomas de pudrición, o coloración y aspecto diferente al resto eran descartados de las pruebas, representando éstos valores entre 0% y 8%.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza, con un nivel de significancia de 5% y test de Tukey para separación de medias, utilizando el software InfoStat (InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), asistido por R (R version 2.11.1 Copyright 2010. The R Foundation for Statistical Computing).

Resultados

Efecto del ambiente térmico durante la etapa de llenado sobre el nivel de dormición de los frutos a cosecha (Objetivo 1).

Experimento 1: Generación de diferentes ambientes térmicos durante la etapa de llenado mediante variaciones en la fecha de siembra, y su relación con el nivel de dormición.

- *Caracterización del ambiente térmico durante el llenado de los frutos*

Los parámetros térmicos estimados muestran que el ambiente térmico explorado por los frutos durante el llenado en la fecha de siembra más tardía (02/12/08) fue de

menores temperaturas que el de las fechas de siembra temprana e intermedia (22/09/08 y 22/10/08) (Cuadro 2.1), las cuales presentaron ambientes térmicos similares.

Las mayores diferencias observadas en el ambiente térmico durante la etapa de llenado entre las dos primeras y la última fecha de siembra tuvieron lugar entre las 10 y las 18 hs. Estas diferencias en el ambiente térmico se produjeron principalmente hacia fines de la etapa de llenado, a partir de los 23 días desde antesis (DDA) (Cuadro 2.1., Fig. 2.4).

Cuadro 2.1. Caracterización del ambiente térmico, radiativo y fotoperiódico durante la etapa de llenado de los frutos en las diferentes fechas de siembra del Experimento 1. El valor de fotoperíodo fue determinado a los 15 días desde primera antesis. Los valores entre paréntesis indican el desvío estándar. Los datos fueron tomados de una estación meteorológica ubicada a 200 metros de las parcelas experimentales.

Parámetro	Temprana (22/09/08)	Intermedia (22/10/08)	Tardía (02/12/08)
Temperatura media de 10 a 18 hs (°C)	26.6 (3.7)	26.3 (3.7)	23.8 (3.6)
Temperatura media diaria (°C)	21.5 (5.5)	21.1 (5.6)	19.7 (4.6)
Temperatura mínima media (°C)	20.5 (5.5)	20.1 (5.6)	18.8 (4.5)
Temperatura máxima media (°C)	22.6 (5.6)	22.3 (5.6)	20.6 (4.6)
Temperatura mínima absoluta (°C)	7.5	6.9	9.5
Temperatura máxima absoluta (°C)	35.3	35.0	33.9
Temperatura media de 10 a 18 hs (Antesis a 22 DDA)	25.9 (4.0)	26.4 (3.5)	24.0 (4.0)
Temperatura media de 10 a 18 hs (23 DDA a MF)	28.0 (2.6)	26.2 (3.9)	23.4 (2.9)
Radiación media 10 a 18 hs (mJ/m ²)	3.2 (1.5)	3.2 (1.4)	2.6 (1.4)
Fotoperíodo a los 15 DDA (hs)	14.2	14.1	13.1

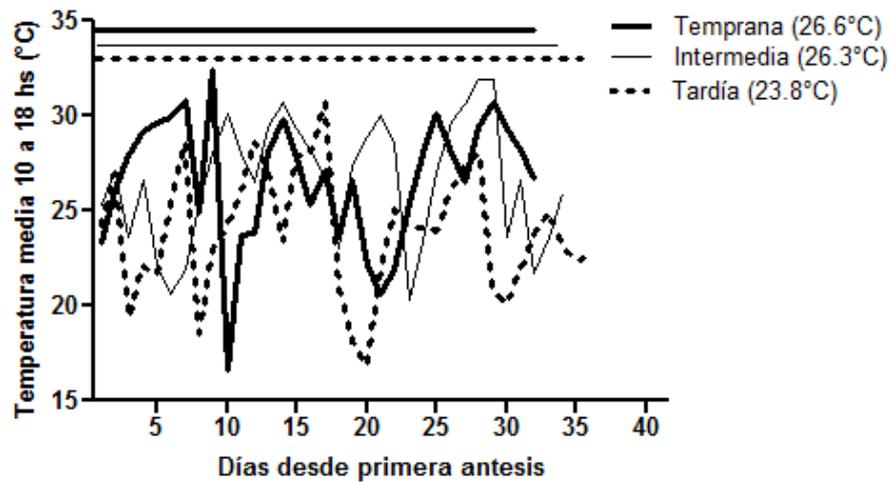


Fig. 2.4. Temperatura media diaria medida desde las 10 hs hasta las 18 hs para la fecha de siembra temprana (línea gruesa), intermedia (línea delgada) y tardía (línea punteada) en función de los días desde primera antesis. Las líneas sobre el gráfico indican la duración del período de llenado hasta madurez fisiológica en cada una de las fechas de siembra. Los valores entre paréntesis en la referencia indican la temperatura media de 10 a 18 hs para todo el período.

▪ *Caracterización del llenado de granos*

Los aquenios provenientes del ensayo de fecha de siembra tardía presentaron una tasa de llenado significativamente menor a la fecha de siembra temprana ($p < 0.001$) e intermedia ($p = 0.0086$), las cuales no presentaron diferencias significativas entre sí ($p = 0.4789$). No existieron diferencias significativas en la duración del llenado entre las tres fechas de siembra ($p = 0.5805$) (Fig. 2.5). Las diferencias observadas en la tasa de llenado determinaron que los aquenios de la fecha de siembra tardía presentasen un peso seco final (i.e. $39.3 \text{ mg} \pm 1.65$) significativamente inferior al observado para aquenios cosechados de la fecha de siembra temprana e intermedia (66.2 ± 2.53 y $65 \text{ mg} \pm 2.68$, respectivamente) (Fig. 2.5).

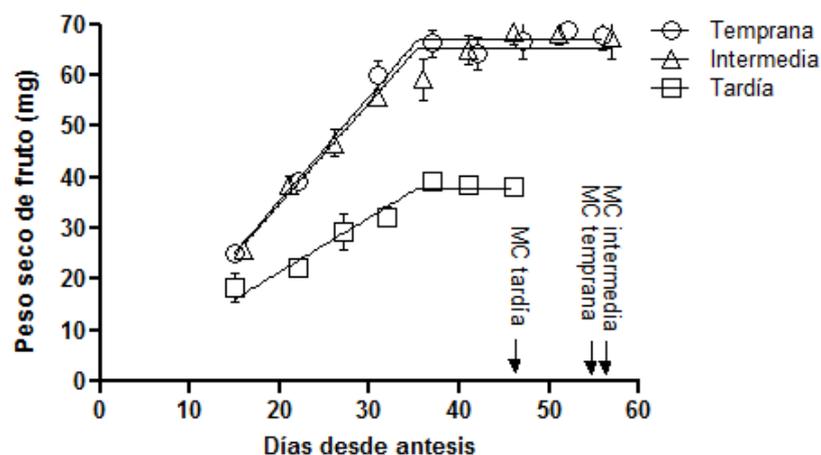


Fig. 2.5. Dinámica del llenado de los aquenios provenientes de la fecha de siembra temprana (círculos), intermedia (triángulos), y tardía (cuadrados). Las flechas indican el momento de madurez comercial (MC) para cada caso. Las barras verticales indican el error estándar. La ecuación que corresponde a las rectas de ajuste para la fecha temprana, intermedia y tardía es $y = 2.2x - 8.3$ ($R^2 = 0.92$); $y = 2x - 4.5$ ($R^2 = 0.88$); $y = 1.1x - 1.6e-11$ ($R^2 = 0.79$), respectivamente.

▪ *Nivel de dormición a cosecha*

Los porcentajes de germinación a cosecha de los aquenios provenientes de la fecha de siembra temprana e intermedia a 25°C de incubación fueron casi nulos, indicando un alto nivel de dormición. Los aquenios provenientes de la fecha de siembra tardía, presentaron valores de germinación a cosecha cercanos al 50%, evidenciando un menor nivel de dormición que aquellos provenientes de fechas de siembra más tempranas (Fig. 2.6). La fecha de siembra tardía alcanzó valores de germinación del 100% a los 30 días post-cosecha, mientras que la fecha de siembra intermedia y temprana alcanzaron ese porcentaje de germinación recién a los 60 y 75 días post-cosecha, respectivamente.

Al exponer a estos aquenios a una temperatura de incubación más baja (11°C), aquellos provenientes de las fechas de siembra temprana e intermedia mantuvieron porcentajes de germinación prácticamente nulos durante todo el período de post-cosecha evaluado, mientras que aquellos provenientes de la fecha de siembra tardía presentaron porcentajes de germinación de 40% y 100% a los 60 y 75 días post-cosecha, respectivamente, mostrando una salida de la dormición anticipada en relación a lo observado en las fechas de siembra temprana e intermedia (Fig. 2.7).

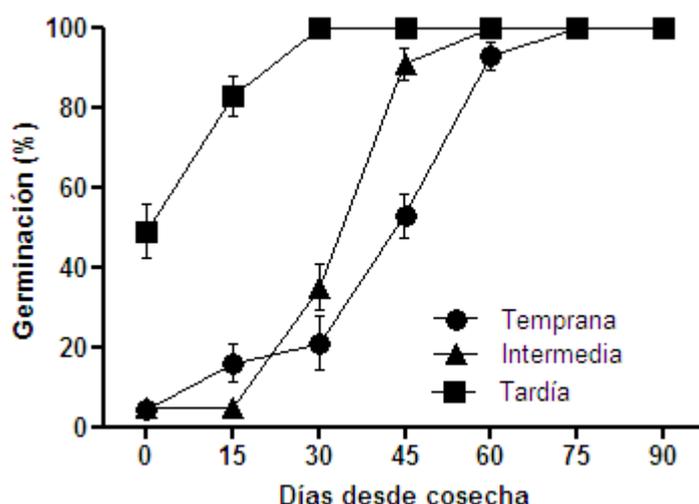


Fig. 2.6. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios provenientes de la fecha de siembra temprana (círculos), intermedia (triángulos) y tardía (cuadrados), en función de los días desde cosecha. Las barras indican el error estándar. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.

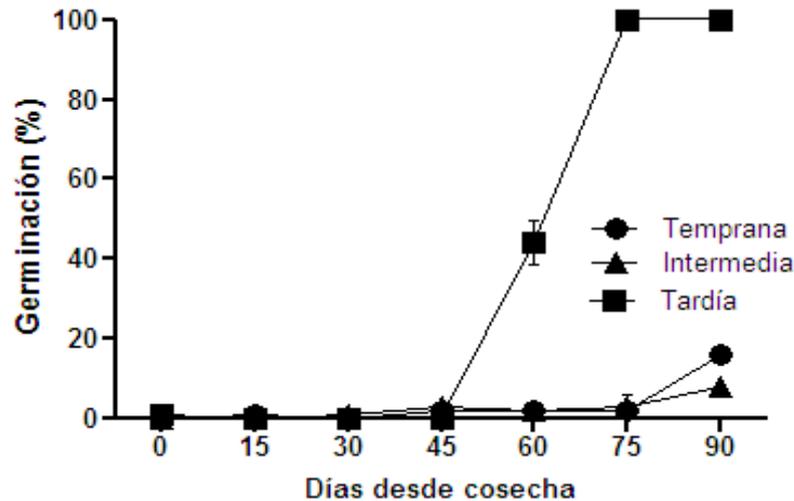


Fig. 2.7. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios provenientes de la fecha de siembra temprana (círculos), intermedia (triángulos) y tardía (cuadrados), en función de los días desde cosecha. Las barras indican el error estándar. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.

Experimento 2: Generación de diferentes ambientes térmicos durante la etapa de llenado mediante el uso de carpas, y su relación con el nivel de dormición.

- *Caracterización del ambiente térmico durante el llenado de los frutos*

En el Experimento 2, la colocación de las carpas generó ambientes térmicos diferenciales durante el período de llenado, observándose un aumento significativo en los valores térmicos registrados en el tratamiento de “alta temperatura” (Cuadro 2.2, Fig. 2.8). Si bien en este último tratamiento se registró una temperatura máxima media y absoluta relativamente altas, esto no afectó el normal desarrollo del cultivo. Las mayores temperaturas registradas en el ambiente testigo del presente experimento (Cuadro 2.2) en comparación con los valores registrados en el experimento 1 (Cuadro 2.1) se debieron posiblemente a las diferencias en el instrumental utilizado para el registro de temperaturas en ambos experimentos. En este experimento se utilizaron dataloggers colocados dentro de tubos de PVC en el canopeo del cultivo, mientras que en el experimento de fechas de siembra se utilizaron los datos registrados por una estación meteorológica ubicada a 200 metros de los ensayos.

Cuadro 2.2. Caracterización del ambiente térmico durante la aplicación de los tratamientos del experimento 2. Los datos fueron tomados por medio de dataloggers ubicados dentro de cada carpa. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Los valores entre paréntesis indican el desvío estándar.

Tratamiento	Temperatura durante la aplicación de los tratamientos (°C)					
	Media de 10 a 18 hs	Media diaria	Mínima media	Máxima media	Mínima absoluta	Máxima absoluta
Alta temp.	37.7 b (4.8)	27.2 b (2.8)	15.2 a (3.1)	43.7 b (4.2)	8.3 a (0.12)	48.8 b (0.65)
Testigo	32.1 a (4.1)	25.2 a (2.7)	16 b (3.0)	36.5 a (3.9)	9.1 b (0.14)	42.8 a (0.39)

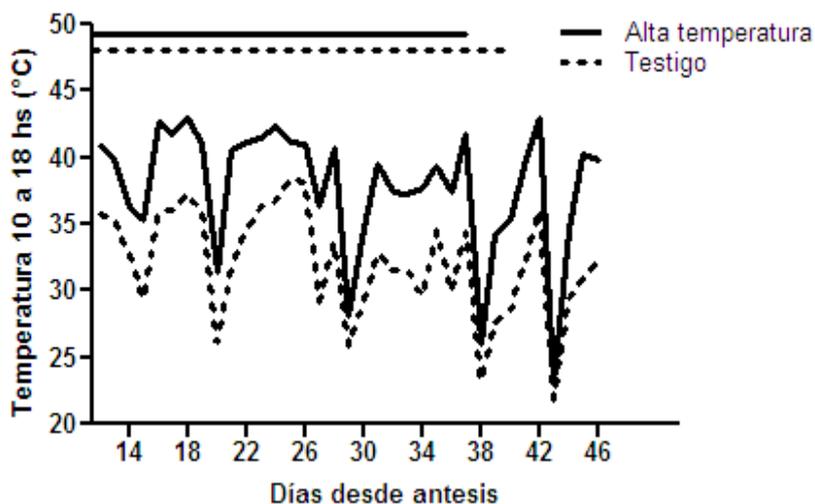


Fig. 2.8. Temperatura media diaria medida desde las 10 hs hasta las 18 hs para el tratamiento de alta temperatura durante el llenado (línea llena), y para el tratamiento testigo (línea punteada) en función de los días desde antesis. Las líneas sobre el gráfico indican la duración del período de llenado hasta madurez fisiológica.

El valor medio diario de humedad relativa correspondiente al ambiente de alta temperatura fue de 70.1% (± 8.8) y el correspondiente al ambiente testigo de menor temperatura fue de 65.1% (± 11.2). En la figura 2.9 se observa la dinámica de los valores de humedad relativa en los tratamientos de alta temperatura y testigo durante el período de aplicación de los tratamientos. En cuanto al valor de radiación registrado bajo las carpas respecto a la radiación en el exterior, éste se mantuvo en el orden del 81.9% (± 2.25).

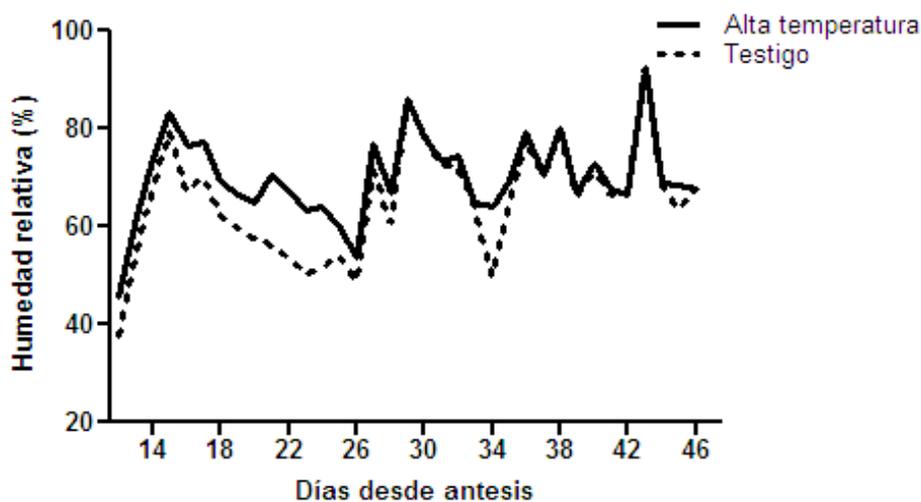


Fig. 2.9. Dinámica del porcentaje de humedad media diaria registrado en el tratamiento de alta temperatura durante el llenado (línea llena) y en el tratamiento testigo (línea punteada) en función de los días desde antesis.

▪ Caracterización del llenado

Los aquenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante el llenado presentaron menor tasa de llenado que aquellos provenientes del tratamiento testigo ($p=0.0015$) (Fig. 2.10). No se registraron diferencias significativas en la duración del

llenado de los aquenios provenientes de ambos ambientes térmicos ($p=0.2309$) (Fig. 2.10). Las diferencias observadas en la tasa de llenado determinaron que los aquenios del tratamiento de alta temperatura presentasen un peso seco final ($45.7 \text{ mg} \pm 1.5$) significativamente inferior al observado para el tratamiento testigo ($61.2 \text{ mg} \pm 2.9$) (Fig. 2.10).

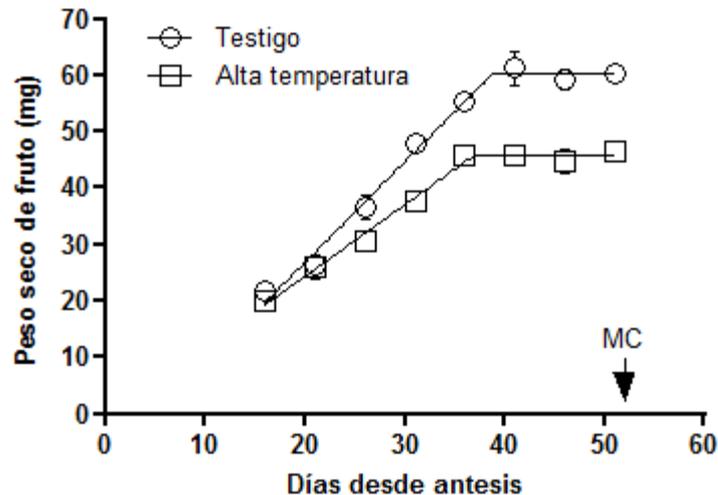


Fig. 2.10. Dinámica del llenado de los aquenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante el llenado (cuadrados) y del tratamiento testigo (círculos). La flecha indica el momento de madurez comercial (MC) para ambos tratamientos. Las barras indican error estándar. La ecuación que corresponde a las rectas de ajuste para el tratamiento de alta temperatura y testigo es $y = 1.8x - 8.7$ ($R^2 = 0.95$); $y = 1.3x - 0.84$ ($R^2 = 0.93$), respectivamente.

- *Nivel de dormición a cosecha*

Los aquenios expuestos a ambos tratamientos térmicos durante el llenado presentaron porcentajes de germinación muy bajos a cosecha, evidenciando altos niveles de dormición al ser incubados a 25°C . Sin embargo, a los quince días luego de cosecha aquellos provenientes del tratamiento testigo mostraron una disminución significativa de su nivel de dormición, alcanzando un 60% de germinación a los treinta días luego de la cosecha, mientras que los expuestos a mayores temperaturas durante el llenado aún presentaban valores de germinación de sólo 20%. A los 45 días luego de la cosecha, los aquenios provenientes del tratamiento testigo alcanzaron el 100% de germinación, mientras que los expuestos a mayores temperaturas aún no superaban el 70% de germinación, mostrando una dinámica de salida de la dormición más lenta que la observada en los provenientes del tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado (Fig. 2.11).

Al ser incubados a una temperatura menor (11°C), los aquenios presentaron porcentajes de germinación casi nulos durante todo el período de post-cosecha evaluado, independientemente del tratamiento térmico al que habían sido expuestos durante el llenado y evidenciando altos niveles de dormición bajo estas condiciones de incubación (Fig. 2.12).

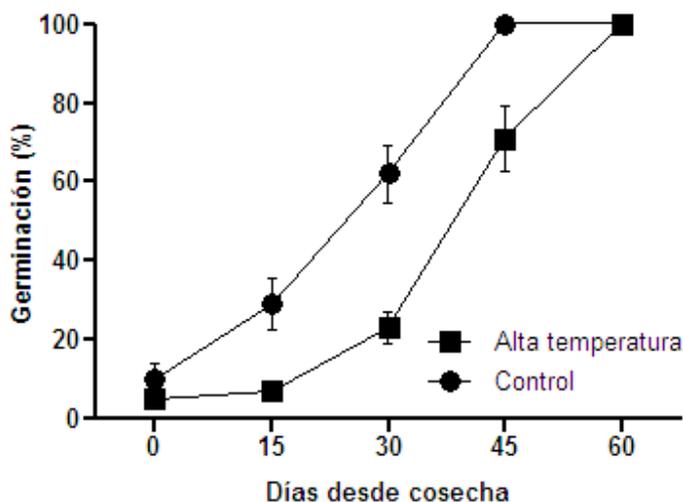


Fig. 2.11. Porcentaje de germinación a 25°C de los achenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante el llenado (cuadrados) y del tratamiento testigo (círculos) en función de los días desde cosecha. Durante la post-cosecha los achenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.

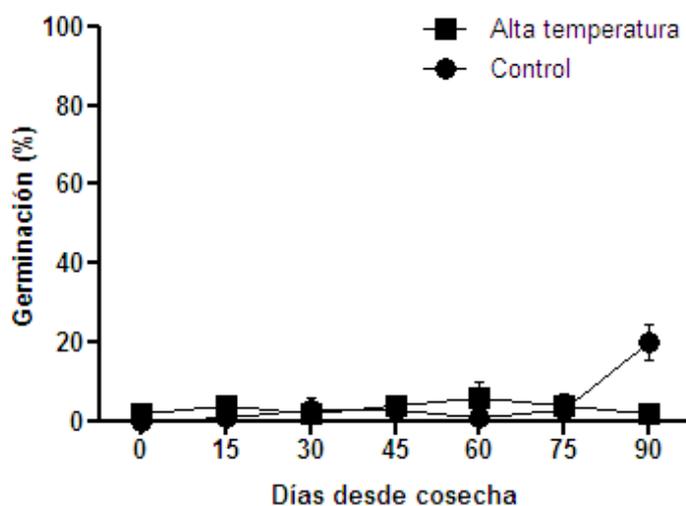


Fig. 2.12. Porcentaje de germinación a 11°C de los achenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante el llenado (cuadrados) y del tratamiento testigo (círculos) en función de los días desde cosecha. Durante la post-cosecha los achenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.

Experimento 3. Generación de diferentes ambientes térmicos en distintos momentos de la etapa de llenado mediante el uso de carpas, y su relación con el nivel de dormición.

- *Caracterización del ambiente térmico durante el llenado de los frutos*

En el Experimento 3, se utilizaron carpas de polietileno con el objetivo de generar cuatro tratamientos basados en ambientes térmicos diferenciales durante el llenado de los granos, observándose diferencias en la temperatura media de 10 a 18 hs, media diaria, máxima media y máxima absoluta como resultado de la aplicación de los tratamientos (Cuadro 2.3). En los tratamientos de alta temperatura durante el llenado, si bien se registró una temperatura máxima media y absoluta relativamente altas, esto no

afectó el normal desarrollo del cultivo. El aumento en la temperatura explorada por las plantas producto de la implementación de la carpas en los distintos momentos durante el llenado puede ser claramente observado en la marcha diaria de la temperatura media medida desde las 10 a las 18 hs (Fig. 2.13).

Cuadro 2.3. Caracterización del ambiente térmico durante la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos (desde los 13 hasta los 26 días DDA, AT1), la segunda etapa (desde los 27 hasta los 46 DDA, AT2), ambas etapas (desde los 13 hasta los 46 DDA, AT1,2) y tratamiento testigo (T). Los datos fueron tomados por medio de dataloggers ubicados dentro de cada carpa. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Los valores entre paréntesis indican el desvío estándar.

Tratamiento	Temperatura durante la aplicación de los tratamientos (°C)			
	1°etapa	2°etapa	1°etapa	2°etapa
	Media de 10 a 18 hs		Media diaria	
AT1	35.6 (5.5) b	32.9 (5.7) a	26.1 (3.2) b	26.4 (2.5) a
AT2	30.9 (3.8) a	36.5 (6.4) b	24.4 (2.9) a	28.0 (2.8) b
AT1,2	34.4 (5.5) b	36.3 (6.6) b	25.7 (3.1) b	27.6 (2.7) b
T	30.3 (3.1) a	32.1 (5.2) a	24.1 (2.7) a	26.0 (2.2) a
	Mínima media		Máxima media	
AT1	16.2 (3.7) a	18.7 (1.9) a	39.4 (5.1) b	36.1 (5.8) a
AT2	16.1 (3.7) a	18.6 (1.8) a	35.6 (4.4) a	40.6 (6.2) b
AT1,2	16.2 (3.7) a	18.6 (1.8) a	37.4 (5.6) a	40.1 (6.4) b
T	16.2 (3.8) a	18.7 (1.9) a	33.6 (3.6) a	34.7 (5.2) a
	Mínima absoluta		Máxima absoluta	
AT1	10.3 (3.7) a	15.2 (1.9) a	46.0 (5.1) b	42.2 (5.8) a
AT2	10.4 (3.7) a	15.5 (1.8) a	42.7 (4.4) a	47.0 (6.2) b
AT1,2	10.1 (3.7) a	15.6 (1.8) a	44.0 (5.6) a	46.1 (6.4) b
T	10.3 (3.8) a	15.2 (1.9) a	38.7 (3.6) a	40.4 (5.2) a

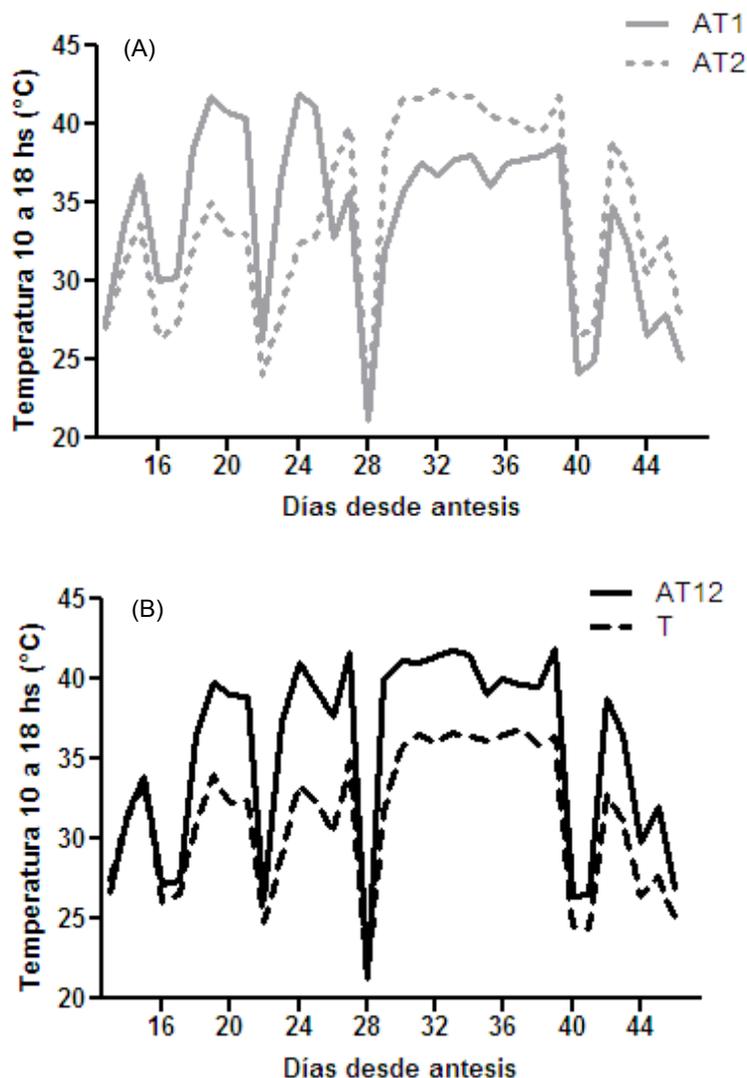


Fig. 2.13. Temperatura media diaria medida desde las 10 hs hasta las 18 hs, en función de los días desde antesis para el tratamiento de alta temperatura durante la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos (13 a 26 DDA, línea llena, AT1) y durante la segunda etapa (27 a 46 DDA, línea punteada, AT2) (A), y durante ambas etapas (13 a 46 DDA, línea llena, AT1,2) y tratamiento testigo (línea punteada, T) (B).

El valor medio diario de humedad relativa para todos los ambientes térmicos correspondiente a la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos se encontró dentro del rango de 76.5 a 81.1 %, y a la segunda etapa, dentro del rango 74.8% a 77.0 % (Cuadro 2.4). En cuanto al valor de radiación registrado bajo las carpas respecto a la radiación en el exterior, éste se mantuvo en el orden del 82% (± 2.2).

Cuadro 2.4. Humedad relativa media diaria para la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos (desde los 13 hasta los 26 DDA, AT1), la segunda etapa (desde los 27 hasta los 46 DDA, AT2), ambas etapas (desde los 13 hasta los 46 DDA AT1,2) y tratamiento testigo (T). El valor entre paréntesis corresponde al desvío estándar.

Tratamiento	Humedad relativa media diaria (%)	
	1° etapa	2° etapa
AT1	78.9 (3.2)	75.0 (2.5)
AT2	76.5 (2.9)	74.9 (2.8)
AT1,2	81.1 (3.0)	74.8 (2.7)
T	76.9 (2.7)	77.0 (2.2)

▪ *Caracterización del llenado*

Se observaron diferencias significativas en la tasa ($p=0.0025$), y en la duración del llenado ($p=0.0277$) entre los diferentes ambientes térmicos evaluados. El tratamiento T (testigo) y el tratamiento AT2 (alta temperatura durante la segunda etapa de llenado) presentaron tasas similares entre sí, y superiores a los tratamientos AT1,2 y AT1 (alta temperatura durante todo el llenado y alta temperatura durante la primera etapa de llenado, respectivamente); estos últimos no mostraron diferencias entre sí. A su vez, el tratamiento T presentó una mayor duración del llenado que el resto de los tratamientos, entre los cuales no se observaron diferencias significativas (Fig. 2.14). Las diferencias observadas en la tasa y duración del llenado determinaron diferencias en los pesos secos finales entre tratamientos. Los aquenios del tratamiento T presentaron un peso seco final significativamente superior al observado en los demás tratamientos ($60.7 \text{ mg} \pm 1.8$), mientras que los aquenios del tratamiento AT2 presentaron un peso seco final intermedio ($54.4 \text{ mg} \pm 2.9$). Por último, los aquenios de los tratamientos AT1,2 y AT1 presentaron un peso seco final significativamente menor a los demás tratamientos ($44.4 \text{ mg} \pm 2.7$ y $42.4 \text{ mg} \pm 4.4$ respectivamente) (Fig. 2.14).

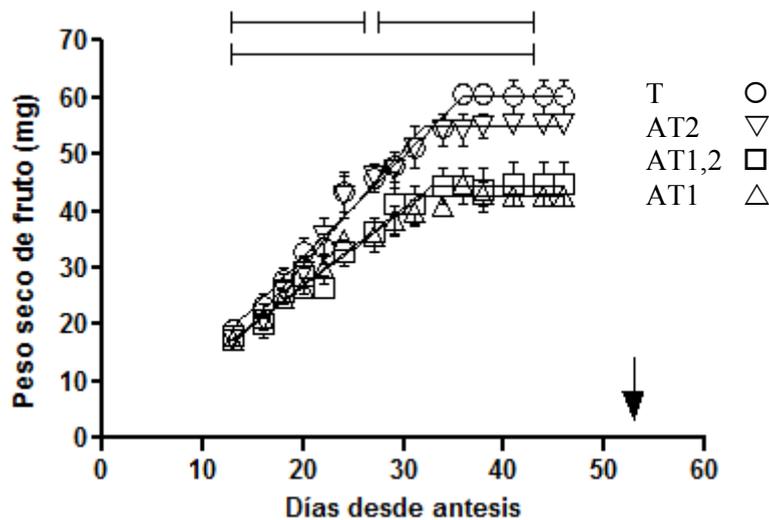


Fig. 2.14. Dinámica del llenado de los achenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos (13 a 26 DDA, AT1: \triangle), durante la segunda etapa (27 a 46 DDA, AT2: ∇), ambas etapas (13 a 46 DDA, AT1,2: \square), y testigo (T: \circ). Las barras horizontales indican la ventana de aplicación de los tratamientos y la flecha vertical indica el momento de cosecha. Las barras verticales indican el error estándar. La ecuación que corresponde a las rectas de ajuste para los tratamientos AT1, AT2, AT1,2 y T son: $y=1.3x-1.8e^{-16}$ ($R^2=0.90$); $y=2x-9.7$ ($R^2=0.90$); $y=1.4x-0.18$ ($R^2=0.80$); $y=1.8x-3.6$ ($R^2=0.90$), respectivamente.

▪ Nivel de dormición

Al igual que lo observado en el experimento 2, el porcentaje de germinación de los achenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante todo el llenado (AT1,2) fue menor que en el tratamiento testigo (T), indicando un mayor nivel de dormición en achenios expuestos a un ambiente de mayor temperatura. El tratamiento de alta temperatura en la primera etapa de aplicación de los tratamientos térmicos (AT1) presentó similar porcentaje de germinación que el tratamiento testigo a los 12 días desde cosecha, mientras que mostró porcentajes levemente inferiores a los 32 y 52 días desde cosecha. Por el contrario, el tratamiento de alta temperatura durante la segunda etapa (AT2) presentó porcentajes de germinación significativamente inferiores al tratamiento testigo, siendo el tratamiento que determinó menores porcentajes de germinación, y en consecuencia, el de mayores niveles de dormición durante el período evaluado (Fig. 2.15).

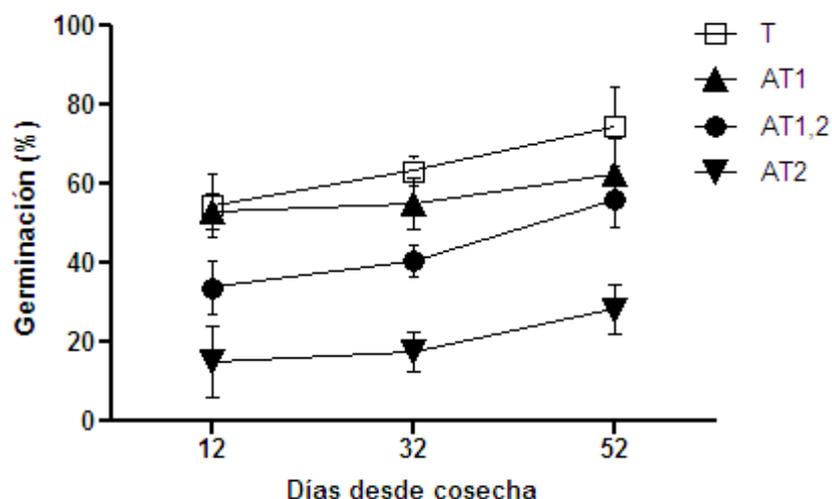


Fig. 2.15. Porcentaje de germinación a 25°C de achenos cosechados de los tratamientos testigo (T), alta temperatura durante la primera etapa de aplicación de tratamientos térmicos (AT1), durante la segunda etapa (AT2) y durante ambas etapas (AT1,2) en función de los días desde cosecha. Las barras verticales indican error estándar.

Efecto de las diferentes estructuras del fruto de girasol en la determinación del nivel de dormición a cosecha y su relación con el ambiente térmico explorado por los frutos durante la etapa de llenado (Objetivo 2).

Experimento 1.1: en un ensayo preliminar, y con el objetivo de evaluar el efecto del pericarpio, de la cubierta seminal verdadera y del embrión en la determinación del nivel de dormición observado en los achenos, se efectuaron pruebas de germinación de achenos, semillas y embriones a 11°C (Fig. 2.16).

A los quince días post-cosecha, la germinación de los achenos fue nula. La remoción del pericarpio determinó un aumento del 12% en el porcentaje de germinación (germinación de semillas), mientras que la remoción tanto del pericarpio como de la cubierta seminal verdadera, determinó porcentajes de germinación del 51.5% (germinación de embriones). Así, la dormición impuesta por las cubiertas explicó el 51.5% de la dormición observada en los achenos. De ese porcentaje, el pericarpio explicó el 12% y la cubierta seminal verdadera explicó el 39.5% (i.e. 51.5-12%). En cuanto a la dormición embrionaria, la misma explicó el 48.5% (i.e. 100-51.5%) de la dormición observada en los achenos.

A los treinta días post-cosecha, los embriones aislados de las cubiertas germinaron completamente, mientras que los achenos presentaron porcentajes de germinación de sólo 2%, indicando altos niveles de dormición. En este sentido, las cubiertas (pericarpio + cubierta seminal verdadera) explicaron el 100% de la dormición expresada por los achenos. Así, de la dormición de los achenos, el pericarpio explicó aproximadamente el 40% y la cubierta seminal verdadera, el 60%, ya que la remoción de estas estructuras incrementó el porcentaje de germinación en esos valores respectivamente (Fig. 2.16).

Resultados similares se observaron a los 45, 60 y 75 días post-cosecha, en los que la remoción de la cubierta seminal verdadera condujo a incrementos de entre el 65% y el 80%, y el pericarpio, entre 15% y 30% dependiendo del momento post-cosecha. A

los 90 días post-cosecha, la remoción de la cubierta seminal verdadera y del pericarpio aumentaron los porcentajes de germinación en un 40% cada uno.

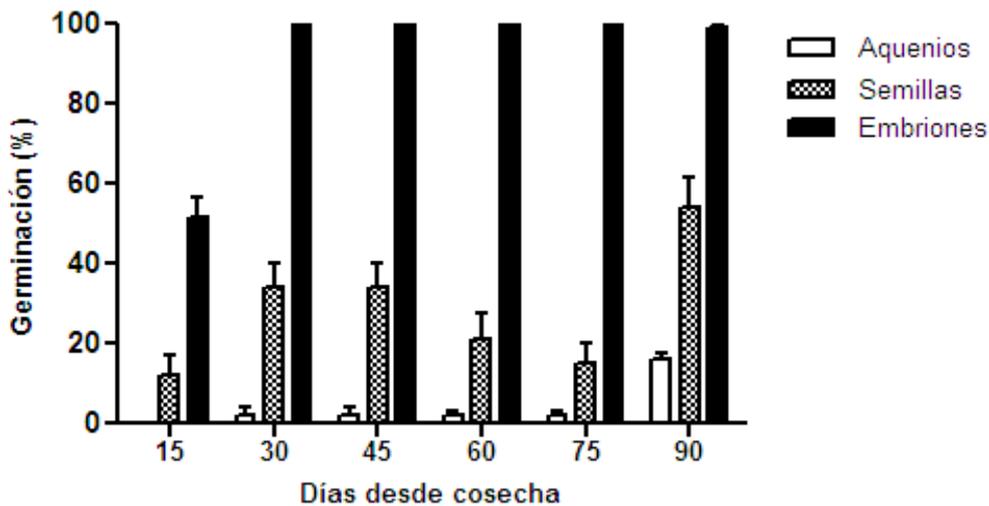


Fig. 2.16. Porcentaje de germinación a 11°C, de aquenios (columnas vacías), semillas (columnas punteadas) y embriones (columnas llenas), en función de los días desde cosecha. Las barras verticales indican error estándar.

Experimento 1.2: con el objetivo de evaluar si los aumentos en el nivel de dormición a cosecha por efecto de la temperatura estuvieron asociados a aumentos en la dormición embrionaria y/o por cubiertas, durante las campañas 2008-2009 y 2009-2010 se efectuaron pruebas de germinación de aquenios y de embriones provenientes de diferentes ambientes térmicos durante el llenado generados mediante diferencias en las fechas de siembra (Experimento 1), o bien, de manera controlada mediante el uso de carpas de polietileno (Experimentos 2 y 3).

Hasta los 45 días post-cosecha, los aquenios provenientes de la fecha de siembra temprana (mayor temperatura durante el llenado) y tardía (menor temperatura durante el llenado) del Experimento 1, presentaron valores de germinación nulos al ser incubados a 11°C (Fig. 2.17). Sin embargo, a los 75 días post-cosecha los aquenios provenientes de la fecha de siembra tardía alcanzaron un porcentaje de germinación del 100%, mientras que los aquenios provenientes de la fecha temprana mantuvieron porcentajes de germinación prácticamente nulos durante todo el período evaluado, evidenciando muy altos niveles de dormición.

En cuanto a los porcentajes de germinación de los embriones aislados de las cubiertas, se observó un comportamiento opuesto al observado en los aquenios. Es decir, los embriones provenientes de la fecha de siembra temprana presentaron porcentajes de germinación superiores a los observados en la fecha de siembra tardía entre los 15 y 60 días post-cosecha. Así, por ejemplo, a los 45 días post cosecha, los embriones provenientes de la fecha de siembra temprana presentaron porcentajes de germinación del 100%, mientras que los provenientes de la fecha de siembra tardía aún presentaban un 20% de germinación, alcanzando el 100% de germinación recién a los 75 días post-cosecha (Fig. 2.17).

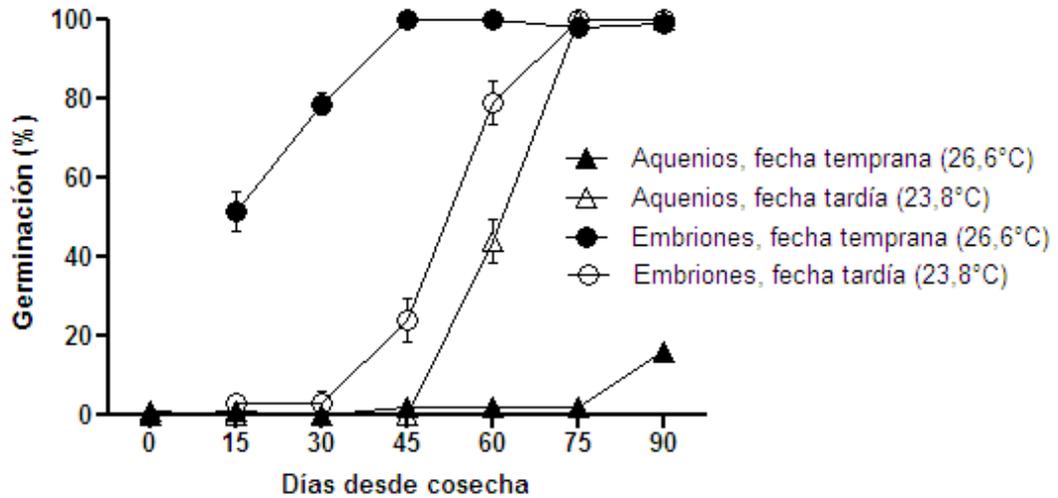


Fig. 2.17. Porcentaje de germinación a 11°C de incubación en función de los días desde cosecha, de aqueños (triángulos) y embriones (círculos) provenientes de la fecha de siembra temprana (símbolos oscuros) y tardía (símbolos claros). Las barras indican error estándar. Los valores entre paréntesis en la referencia indican la temperatura media de 10 a 18 hs para todo el período. Durante la post-cosecha, los aqueños se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.

Los aqueños provenientes del Experimento 2 (campaña 2008-2009), también presentaron altos niveles de dormición al ser incubados a 11°C al momento de la cosecha (Fig. 2.18). Sin embargo, a los 90 días post-cosecha, los aqueños provenientes del ambiente testigo evidenciaron un leve aumento en el porcentaje de germinación (20%), mientras que los provenientes del ambiente de alta temperatura mantuvieron porcentajes de germinación nulos.

En relación al comportamiento de los embriones, hasta los 30 días post-cosecha aquellos provenientes del ambiente de alta temperatura durante el llenado presentaron mayores porcentajes de germinación que aquellos provenientes del ambiente de menor temperatura (Fig. 2.18). Posteriormente los embriones provenientes de ambos tratamientos presentaron valores similares de germinación, alcanzando un 100% de germinación a los 45 días post-cosecha.

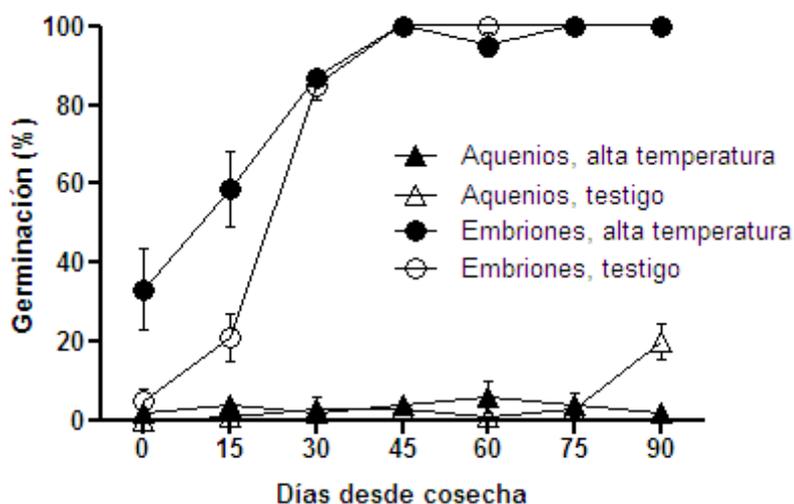


Fig. 2.18. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios (triángulos) y embriones (círculos), provenientes del ambiente de alta temperatura durante el llenado (símbolos oscuros), y del ambiente testigo de menor temperatura durante el llenado (símbolos claros), en función de los días desde cosecha. Las barras indican error estándar. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 25°C en seco.

Al igual que lo observado en los experimentos 1 y 2, los niveles de dormición a cosecha de los aquenios del Experimento 3 fueron elevados, mostrando porcentajes de germinación casi nulos al ser incubados a 11°C (Fig. 2.19). Cuando se removió solamente el pericarpio, las semillas provenientes del ambiente térmico de mayor temperatura durante el llenado (AT1,2) no superaron el 10% de germinación, mientras que aquellas semillas provenientes del tratamiento testigo (T) alcanzaron porcentajes de germinación del 40% (Fig. 2.19). Sólo cuando se removió el pericarpio más la cubierta seminal verdadera, los embriones provenientes del ambiente AT1,2 disminuyeron significativamente su nivel de dormición, germinando cerca del 90% (Fig. 2.19), mientras que los provenientes del ambiente T germinaron en valores cercanos al 50%, un valor similar al observado sin haber removido la cubierta seminal verdadera (Fig. 2.19).

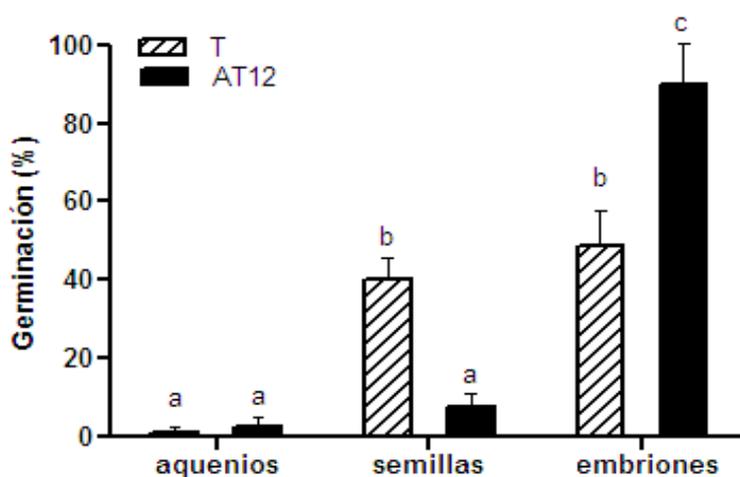


Fig. 2.19. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios, semillas y embriones provenientes de aquenios expuestos a alta temperatura durante el llenado (AT1,2, columnas negras) y al tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado (T, columnas rayadas). Las barras verticales indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Cuando el mismo lote de frutos fue incubado a 25°C, el porcentaje de germinación de los achenios provenientes del ambiente AT1,2 fue menor (i.e. mayor nivel de dormición) que el observado en los achenios del ambiente T (Fig. 2.20). La remoción del pericarpio no tuvo efectos significativos sobre la germinación de las semillas provenientes del ambiente AT1,2, mientras que aumentó significativamente la germinación de las semillas provenientes del ambiente T. Al igual que lo observado a 11°C de incubación, sólo cuando se removió el pericarpio más la cubierta seminal verdadera, los embriones provenientes del ambiente AT1,2 incrementaron su porcentaje de germinación, no expresando dormición embrionaria a esta temperatura (Fig. 2.20).

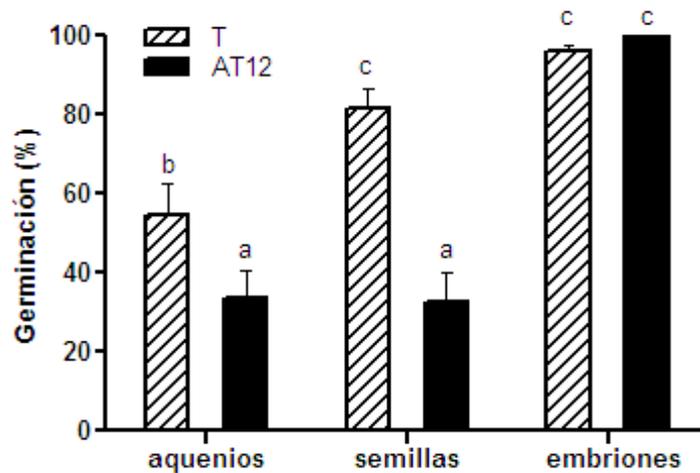


Fig. 2.20. Porcentaje de germinación a 25°C de achenios, semillas y embriones provenientes de achenios expuestos a alta temperatura durante el llenado (AT1,2, columnas negras) y al tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado (T, columnas rayadas). Las barras verticales indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Sensibilidad al ABA en función del ambiente térmico explorado por los frutos durante el llenado y su relación con el nivel de dormición a cosecha (Objetivo 3).

En la figura 2.21 se observa, nuevamente, que los achenios provenientes del tratamiento de alta temperatura durante el llenado presentaron mayores niveles de dormición que los achenios del tratamiento testigo cuando fueron incubados en agua a 25°C. El agregado de fluridone, determinó un aumento significativo de los porcentajes de germinación en ambos tratamientos en relación a lo observado en los achenios incubados en agua. En forma contraria, el agregado de ABA 10 uM al medio de incubación disminuyó los niveles de germinación respecto a los observados en el tratamiento control (fluridone), sin observarse diferencias entre los tratamientos térmicos. Sin embargo, el agregado de ABA 50 uM condujo a una respuesta diferencial entre ambos tratamientos, dado que disminuyó en mayor medida el porcentaje de germinación respecto al medio control (fluridone) en los achenios expuestos al ambiente de alta temperatura durante el llenado que en los achenios expuestos al ambiente testigo (Fig. 2.21).

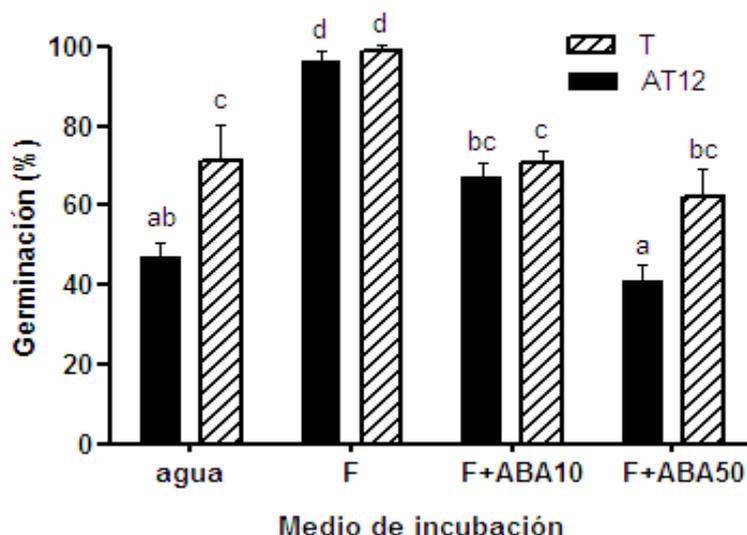


Fig. 2.21. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios a los 40 días post-cosecha, provenientes del ambiente de alta temperatura durante el llenado (AT1,2, columnas negras) y tratamiento testigo de menor temperatura (T, columnas rayadas), en agua, fluridone 100 uM (F), fluridone 100 uM + ABA 10 uM (F+ABA10) ó 50 uM (F+ABA50). Las barras verticales indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. Durante la post-cosecha los aquenios se mantuvieron almacenados a 5°C en seco.

Discusión y conclusiones

Las condiciones ambientales exploradas por las semillas y/o frutos durante su desarrollo y maduración en la planta madre (i.e. llenado de granos) pueden afectar el nivel de dormición de las mismas a cosecha (Fenner, 1991). Los resultados obtenidos en los experimentos descritos en el presente capítulo aportan claras evidencias de que el ambiente térmico explorado por los frutos de girasol durante la etapa de llenado afecta el nivel de dormición de los mismos a cosecha y su posterior dinámica de salida de la dormición. En este sentido, ambientes de mayores temperaturas durante el llenado, se asociaron con mayores niveles de dormición de los aquenios a cosecha y durante la post-cosecha (Fig. 2.6, 2.7, 2.11 y 2.15). Tanto los experimentos de diferentes fechas de siembra como los de aplicación de ambientes térmicos diferenciales durante el llenado de manera controlada evidenciaron este tipo de asociación. Las diferencias en el nivel de dormición de los frutos según el ambiente térmico al que se expusieron durante el llenado se observaron a “baja” (11°C) y “alta” (25°C) temperatura de incubación (Fig. 2.6 y 2.7; 2.19 y 2.20). Estos resultados, obtenidos mediante ensayos conducidos en condiciones de campo bajo un régimen térmico variable y utilizando las mismas prácticas que las aplicadas en el proceso de producción de semilla híbrida a nivel comercial, son consistentes con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas y temperaturas constantes por Fonseca (2000) y Rodríguez *et al.* (2003). En el trabajo de Fonseca (2000) esta respuesta se observó para los tratamientos de temperaturas más contrastantes (12.9 vs 35°C, y 24.4 ó 26.1 vs 31.6°C), no observándose diferencias significativas en los niveles de dormición de los frutos provenientes de los ambientes menos contrastantes (24.4 y 26.1°C). Rodríguez *et al.* (2003) realizaron ensayos donde se expusieron las plantas de girasol a temperaturas contrastantes (25 y 35°C) durante todo el llenado, o durante breves períodos (7 días). En estos ensayos, la exposición a altas temperaturas también resultó en mayores niveles de dormición de los frutos, pero sólo cuando se aplicaron durante todo el llenado, ya que los períodos de 7 días de alta

temperatura no afectaron el nivel de dormición de los mismos. En el presente capítulo se observó que un período de 19 días de exposición a “altas” temperaturas, particularmente hacia finales del llenado, sería suficiente para determinar diferencias en el nivel de dormición de los frutos a cosecha (Fig. 2.15). Por otro lado, en los experimentos del presente capítulo, las diferencias de temperatura media diaria entre los ambientes de mayor y menor temperatura durante el llenado fueron de alrededor de 2°C (Cuadro 2.1, 2.2 y 2.3), mientras que en el trabajo de Rodríguez *et al.* (2003) y Fonseca (2000) fueron mayores (10°C y 7 ó 22°C, respectivamente). Estas observaciones permiten suponer que aún pequeñas diferencias en la temperatura media diaria en condiciones de cultivo a campo, podrían determinar diferencias significativas en el nivel de dormición a cosecha y en el patrón de salida de la dormición durante la post-cosecha.

Los resultados descriptos en este capítulo indican que, para el híbrido evaluado, la dormición primaria se expresa mayormente a bajas temperaturas, dado que los aquenios incubados a 11°C presentaron menores valores de germinación que aquellos a 25 °C (Fig. 2.6 y 2.7, Fig. 2.11 y 2.12, Fig. 2.19 y 2.20). También se observó que a medida que los aquenios salen de la dormición adquieren paulatinamente la capacidad de germinar a temperaturas cada vez más bajas, explicando de este modo los resultados obtenidos, en donde los aquenios en un principio comenzaron a germinar a 25°C (Fig. 2.6) y posteriormente adquirieron la capacidad de germinar a 11°C (Fig. 2.7). Estas observaciones son consistentes con las reportadas por Corbineau *et al.* (1990), en las que la pérdida paulatina de la dormición de los aquenios fue acompañada por un aumento de la capacidad de los mismos de germinar a bajas temperaturas (5°C a 15°C), así como a temperaturas mayores a la óptima. Si bien se ha reportado en algunos trabajos previos que la imposibilidad de los aquenios de germinar a bajas temperaturas de incubación (menores a 25°C), se debía principalmente a una dormición embrionaria (Corbineau *et al.*, 1990), los resultados del presente trabajo indicarían que la dormición impuesta por las cubiertas también explicaría una proporción importante de la dormición observada en los aquenios incubados a bajas temperaturas (Fig. 2.16), especialmente cuando se experimentan ambientes de mayores temperaturas durante el llenado (Fig. 2.17, 2.18 y 2.19).

Los resultados obtenidos sugieren, además, que la regulación del nivel de dormición a cosecha ejercida por el ambiente térmico explorado por los frutos tendría lugar en las etapas finales del llenado-inicio de secado en la planta madre (Fig. 2.15). Así, ambientes térmicos diferenciales hacia las etapas finales del llenado determinarían diferencias en el nivel de dormición a cosecha, mientras que ambientes térmicos diferenciales en las etapas iniciales del llenado no conducirían a diferencias significativas en el nivel de dormición. Según los resultados obtenidos en el presente capítulo, la exposición a mayores temperaturas a partir de los 454°Cd desde anthesis (temperatura base 6°C; Pereyra-Irujo y Aguirrezábal, 2007) tuvo efectos significativos en el nivel de dormición, mientras que la exposición a un ambiente similar previo a los 454°Cd no tuvo efectos significativos. Un patrón de respuesta similar fue reportado en cebada, en donde la temperatura experimentada por los frutos hacia fines del llenado (i.e. 300-350 °Cd desde el inicio de llenado de grano, temperatura base 5.5°C) fueron las que presentaron mayor correlación con los niveles de dormición observados a cosecha (Rodríguez *et al.*, 2001). Es importante destacar que la relación observada en cebada fue inversa a la reportada en este trabajo para girasol, en el caso de cebada, altas temperaturas hacia finales del llenado determinaron un menor nivel de dormición de los frutos. La cebada es un cereal de invierno, mientras que el girasol es un cultivo de

verano, lo cual podría estar relacionado con el efecto opuesto que ejercen las altas temperaturas en la fase tardía del llenado sobre el posterior nivel de dormición.

El mayor nivel de dormición observado en los frutos expuestos a mayores temperaturas en la segunda etapa de llenado (AT2) en relación a lo observado en aquellos expuestos a mayores temperaturas durante todo el llenado (AT1,2) en el experimento 3 (Fig. 2.15) podría deberse a que los primeros estuvieron expuestos a temperaturas levemente superiores en la segunda etapa del llenado (Cuadro 2.3). Asimismo, estas diferencias también podrían estar asociadas al hecho de que la ocurrencia de ambientes de alta temperatura en forma “abrupta” durante el llenado tuviese un efecto diferencial sobre el nivel de dormición que la exposición durante períodos más prolongados (i.e. todo el llenado). Se requerirán futuras investigaciones para comprender los posibles mecanismos involucrados en estas respuestas.

En relación a la magnitud de los efectos observados en los distintos experimentos realizados, el retraso en la fecha de siembra (Fig. 2.6 y 2.7) generó una mayor diferencia en el nivel de dormición que la diferencia resultante de la aplicación de ambientes térmicos diferenciales en forma controlada (Fig. 2.11, 2.12 y 2.15). Esta diferencia sugiere que la temperatura no sería el único factor ambiental que estaría regulando los niveles de dormición durante el período de llenado en frutos de esta especie. En este sentido, la siembra en diferentes fechas implicó cambios no sólo en el ambiente térmico, sino también en otros factores ambientales, tales como fotoperíodo y radiación (Cuadro 2.1). Se han reportado cambios en el nivel de dormición en varias especies asociados a diferencias en la radiación y/o en el fotoperíodo (Fenner, 1991). Por ejemplo, en quinoa se observó que fotoperíodos cortos durante la etapa de llenado se asociaron a menores niveles de dormición a cosecha (Ceccato *et al.*, 2011), al igual que en *Portulaca oleracea* (Gutterman, 1974) y *Lactuca sativa* (Gutterman, 1973), entre otros reportados por Fenner (1991).

En relación a las estructuras del fruto que estarían involucradas en la regulación de la dormición en girasol, los altos niveles de dormición observados en los aquenios resultaron de la co-existencia de dormición embrionaria y dormición por cubiertas (Fig. 2.16). Sin embargo, la dormición embrionaria se perdió rápidamente durante la post-cosecha, mientras que la dormición por cubiertas (i.e. cubierta seminal verdadera y pericarpio) se mantuvo por más tiempo. Estos resultados son coherentes con los reportados por Corbineau *et al.* (1990), en los que los embriones aislados de las cubiertas se liberaron completamente de la dormición luego de 30 días de almacenaje, mientras que los frutos completos lo hicieron luego de 60 días de almacenaje, debido a una mayor duración de la imposición de la dormición por cubiertas. Los resultados descritos en este capítulo sugerirían, además, que la cubierta seminal verdadera sería el tejido que explicaría en mayor proporción la dormición observada en los aquenios, ya que su remoción condujo generalmente a mayores incrementos en el porcentaje de germinación que la remoción del pericarpio (Fig. 2.16). Según trabajos efectuados por Rolletschek *et al.* (2007), la difusión de oxígeno al embrión está principalmente limitada por esta estructura, y no por el pericarpio. En base a estos resultados, la cubierta seminal verdadera podría estar regulando el nivel de dormición de los embriones por medio de limitaciones a la entrada de oxígeno al embrión.

A su vez, la proporción de la dormición explicada por el embrión o por las cubiertas fue diferente según el ambiente térmico al que se expusieron los aquenios

durante la etapa de llenado. En los aquenios expuestos a ambientes de mayor temperatura durante el llenado, la dormición por cubiertas explicó en mayor porcentaje los niveles de dormición observados, mientras que se observó una menor dormición embrionaria. En contraste, para los aquenios expuestos a un ambiente de menor temperatura durante el llenado, la dormición embrionaria explicó en mayor medida los niveles de dormición observados (Figs. 2.17, 2.18, 2.19). Resultados similares fueron reportados por Rodríguez *et al.*, (2003) en girasol, donde mayores temperaturas de llenado se asociaron a una mayor dormición impuesta por cubiertas, y por Ceccato *et al.*, (2011) en quinoa, en donde los ambientes de mayor temperatura durante el llenado también se relacionaron con mayores niveles de dormición impuesta por cubiertas y menores niveles de dormición embrionaria. Como se comentara previamente, la respuesta más generalizada entre las especies es que aumentos en la temperatura media diaria durante el llenado se asociarían a disminuciones en los niveles de dormición. Según los resultados de este trabajo, en girasol esta respuesta es particularmente cierta para los embriones, y no así para el fruto completo, en el que la respuesta sería contraria, al igual que lo descrito para quinoa (Ceccato *et al.*, 2011).

Si bien ambas cubiertas (pericarpio y cubierta seminal verdadera) tuvieron efectos en la imposición de la dormición, su influencia fue diferente según el ambiente térmico explorado por los frutos durante el llenado. Así, en frutos expuestos a un ambiente de mayor temperatura durante el llenado, con mayores niveles de dormición, la cubierta seminal verdadera fue la que explicó en mayor medida los niveles de dormición de los frutos, ya que su remoción condujo a incrementos significativos en el porcentaje de germinación, mientras que la remoción del pericarpio no presentó ningún efecto en estos frutos (Fig. 2.19 y 2.20). Por el contrario, en frutos expuestos a un ambiente de menor temperatura durante el llenado, con menores niveles de dormición, el pericarpio fue la cubierta que explicó en mayor medida los niveles de dormición de los frutos, ya que su remoción condujo a incrementos en el porcentaje de germinación, mientras que la remoción de la cubierta seminal verdadera no presentó diferencias significativas en el porcentaje de germinación resultante (Fig. 2.19 y 2.20). Estos resultados sugerirían que el ambiente de maduración de las semillas (en este caso el ambiente térmico) podría ejercer efectos diferenciales sobre ambas estructuras, y esto a su vez, podría afectar la naturaleza de la dormición impuesta por las cubiertas en cada caso.

En girasol, Le Page-Degivry *et al.* (1992, 1996) observaron que la dormición estaba mediada por la capacidad de síntesis de ABA *de novo* del embrión. Los resultados de este capítulo confirman estos reportes, ya que el agregado de un inhibidor de la síntesis de ABA condujo a la liberación completa de la dormición de los aquenios provenientes de ambos tratamientos térmicos durante el llenado (Fig. 2.21). Por otro lado, el agregado de ABA exógeno (50 μ M) al medio de incubación determinó una disminución diferencial de los niveles de germinación respecto al medio control (fluridone) según el ambiente térmico explorado durante el llenado, donde el efecto inhibitorio del ABA fue más acentuado en los aquenios expuestos a ambientes de mayor temperatura. Estos resultados sugieren que estos aquenios presentarían una mayor sensibilidad a ABA. Por lo tanto, los resultados obtenidos nos permiten sugerir que los mayores niveles de dormición asociados a ambientes de llenado más cálidos estarían mediados, al menos en parte, por una mayor sensibilidad de los embriones a esta hormona.

Es importante destacar que, dado que existen evidencias que indican que la imposición de la dormición en embriones de girasol está determinada por un pico de producción de ABA durante la primera etapa del llenado (Le Page-Degivry *et al.*, 1990), se esperaría entonces que el nivel de dormición a cosecha estuviese determinado por diferencias en el ambiente térmico explorado durante esa misma etapa. Sin embargo, según se observara en este trabajo, es recién en etapas avanzadas del llenado en las cuales los cambios en el ambiente térmico influirían en el nivel de dormición resultante (Fig. 2.15). Esto podría deberse al hecho de que lo que parecería explicar el nivel de dormición es la sensibilidad de los embriones al ABA, y no el contenido de la hormona, y que esta sensibilidad podría estar definiéndose durante etapas avanzadas del llenado.

El esquema presentado en la figura 2.22 resume los principales resultados descriptos en este capítulo en relación al efecto del ambiente térmico experimentado por los frutos durante el llenado sobre el nivel de dormición a cosecha y durante la post-cosecha. La contribución de las diferentes estructuras del fruto (embrión y cubiertas) en la determinación del nivel de dormición, la sensibilidad de los embriones al ABA, y su asociación con las diferencias en el ambiente térmico experimentado por los frutos durante la etapa de llenado.

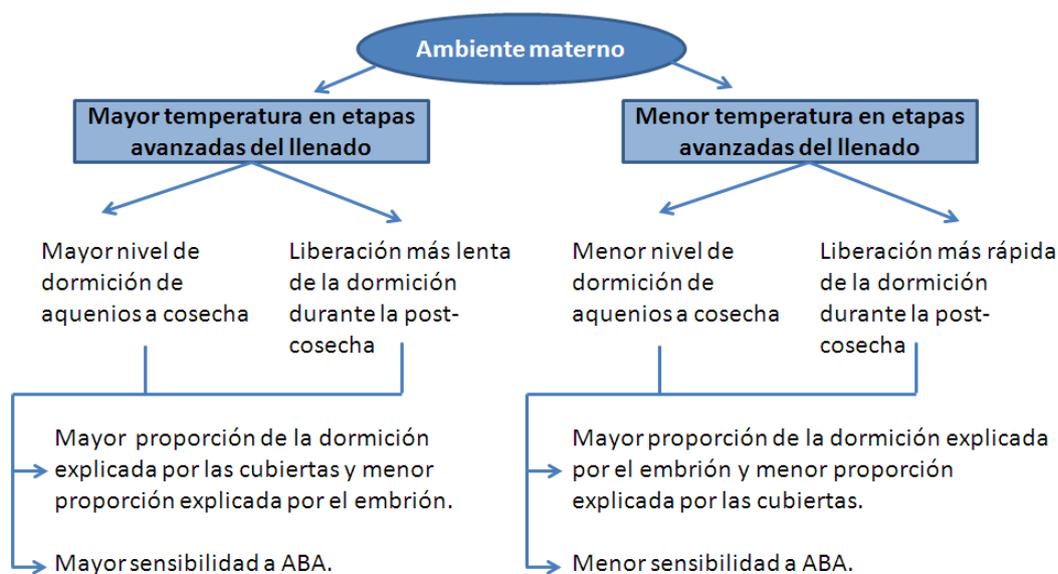


Fig. 2.22: Representación esquemática del efecto del ambiente térmico materno sobre el nivel de dormición a cosecha, y su relación con el tipo de dormición predominante y la sensibilidad de los embriones al ABA.

CAPÍTULO 3

EFECTO DEL AMBIENTE TÉRMICO EXPLORADO DURANTE LA ETAPA DE ALMACENAJE POST-COSECHA SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN EN FRUTOS DE GIRASOL

CAPÍTULO 3: EFECTO DEL AMBIENTE TÉRMICO EXPLORADO DURANTE LA ETAPA DE ALMACENAJE POST-COSECHA SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN EN FRUTOS DE GIRASOL

Introducción

Numerosas especies presentan altos niveles de dormición al momento de su dispersión o cosecha, que luego disminuyen durante etapas posteriores. Existen evidencias que indican que la tasa con la que disminuyen estos niveles de dormición (i.e. tasa de salida de la dormición) se encuentra regulada por el ambiente térmico al que se encuentran expuestas las semillas (Batlla y Benech-Arnold, 2010). En algunas especies, como ciertas forestales y hortícolas, la salida de la dormición se acelera ante la exposición a bajas temperaturas en húmedo (Allen *et al.*, 2007). Por el contrario, en otras especies, es la exposición a altas temperaturas en seco lo que acelera la salida de la dormición. Ejemplos de este tipo de respuesta, en donde mayores temperaturas aumentan la tasa de salida de la dormición, han sido documentados para *Chenopodium album* (Karssen, 1970), *Chenopodium quinoa* (Ceccato *et al.*, 2011), arroz (Roberts, 1962), *Dactylis glomerata* (Stoyanova y Kostov, 1983), *Festuca arundinacea* (Stoyanova *et al.*, 1984) y *Bromus tectorum* (Bauer *et al.*, 1998).

En el cultivo de girasol, existen reportes con respuestas contrastantes en relación al efecto de la temperatura de almacenaje post-cosecha sobre el nivel de dormición. Algunos indican que las bajas temperaturas durante la post-cosecha se asociarían a disminuciones en el nivel de dormición. Por ejemplo, según trabajos efectuados por Cseresnyes (1979) un corto período de almacenaje a 0°C resultó efectivo en la disminución de los niveles de dormición en relación a lo observado en frutos conservados a temperatura ambiente. Sin embargo, otros reportes indican sólo leves disminuciones de la dormición ante bajas temperaturas (Seiler, 1998), y otros, directamente no observan ningún efecto (Brunick, 2007). Por ejemplo, en trabajos efectuados por Seiler (1998), se observó que frutos de girasol silvestre (*Helianthus annuus*) disminuyeron sólo parcialmente el nivel de dormición cuando los mismos fueron almacenados a baja temperatura (4°C), en relación a lo observado en aquellos almacenados a mayor temperatura (20°C). En cuanto a tratamientos basados en cortos períodos de exposición a bajas temperaturas, Brunick (2007) no observó diferencias entre los niveles de dormición de frutos de girasol almacenados a temperaturas contrastantes (-20°C, 20°C y 50°C), para ninguno de los genotipos de girasol que fueron evaluados. Recientemente, trabajos efectuados por Bazin *et al.* (2011) en los que se evaluó la respuesta de embriones aislados de las cubiertas almacenados a 15, 20, 25 y 30°C, sugieren la existencia de una interacción entre la temperatura de almacenaje y el contenido de humedad de los embriones en relación a la salida de la dormición. Así, en embriones con contenidos de humedad entre 2.5 y 5%, la liberación de la dormición fue más rápida cuando éstos fueron almacenados a menores temperaturas, mientras que a contenidos de humedad entre 10 y 12%, la salida de la dormición se aceleró a mayores temperaturas de almacenaje. Sin embargo, en ese trabajo no se evaluó la respuesta utilizando experimentalmente los contenidos de humedad bajo los cuales se almacenan los lotes de girasol durante los procesos de producción de semilla a nivel comercial (i.e. 5.5 a 6%).

Algunos trabajos disponibles en la literatura indican que la imposibilidad de los frutos de girasol de germinar a cosecha estaría asociada a la presencia de dormición

impuesta por el embrión y por las cubiertas. Este alto nivel de dormición que los frutos expresan a cosecha suele disminuir con el tiempo durante el almacenaje en seco (Corbineau *et al.*, 1988). La dormición embrionaria en general se pierde rápidamente, mientras que la impuesta por las cubiertas requiere más tiempo para disminuir (Benech-Arnold, 2004). En base a estos reportes, y al hecho de que el ambiente térmico de almacenaje post-cosecha es un importante regulador de la dormición en la mayoría de las especies estudiadas, resulta de interés conocer si la temperatura a la que se exponen los frutos de girasol durante el almacenaje post-cosecha regula en forma diferencial la dormición embrionaria y por cubiertas que suelen presentar los frutos a cosecha.

Las hormonas vegetales ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GAs) han sido reconocidas como potenciales reguladores de los niveles de dormición en semillas de numerosas especies (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La acción de una hormona depende de su concentración en los tejidos o sitios de acción, de la sensibilidad de los tejidos a la hormona y de la presencia de otras hormonas (que pueden antagonizar o potenciar sus efectos). Mientras que el ABA es un promotor de la inducción y del mantenimiento de la dormición, las giberelinas son promotoras de la germinación, al estimular el ablandamiento de los tejidos que actúan como “barrera” (ej. endosperma y cubiertas), la removilización de reservas y la expansión del embrión.

En girasol, Le Page-Degivry *et al.* (1996), encontraron que aplicaciones de ABA exógeno a embriones aislados en distintos momentos del desarrollo podían inducirlos en dormición dependiendo de la edad de los mismos. Esta “capacidad” de los embriones para ser inducidos en dormición por ABA fue muy baja en una etapa temprana (primeros 10 días post-antesis) pero aumentó rápidamente a partir de los 13 días post-antesis, reflejando diferencias a lo largo del desarrollo en la sensibilidad al ABA para la inducción de la dormición. En otras palabras, para que el ABA sea efectivo en inducir la dormición, el embrión debe ser capaz de transmitir y responder a la señal del ABA, o sea ser “sensible” a esta hormona. Estos autores (Le-Page Degivry *et al.*, 1996) también evaluaron cambios en la sensibilidad al efecto inhibitorio del ABA en la germinación de frutos maduros, y encontraron que la sensibilidad al ABA disminuyó durante la salida de la dormición en la etapa de post-maduración. En cuanto a la sensibilidad a las GAs, los mismos autores han observado que a medida que disminuye el nivel de dormición de los embriones por efecto de diferentes tratamientos, como por ejemplo, secado, lavado de embriones en agua en agitación o largos períodos de almacenaje, la aplicación de GAs exógenas es progresivamente más efectiva en la promoción de la germinación, indicando una mayor sensibilidad a GAs por parte de estos embriones.

Otra hormona involucrada en la determinación del nivel de dormición es el etileno. Esta hormona promovería la terminación de la dormición a través de la atenuación de la señalización del ABA y de los niveles de ABA (Finkelstein *et al.* 2008). En girasol, Corbineau *et al.* (1990) observaron que la aplicación exógena de etileno estimuló la germinación de aquenios y de embriones inmaduros con altos niveles de dormición, y que algunos inhibidores de la síntesis o de la acción del etileno inhibieron la germinación de embriones que ya se habían liberado de la dormición.

Más allá de las evidencias disponibles en relación al control hormonal de la dormición en embriones de girasol, no existen trabajos que hayan evaluado si los posibles efectos del ambiente térmico durante el almacenaje post-cosecha sobre la salida de la dormición modulan los niveles de dormición a través de cambios en la capacidad

de síntesis o en la sensibilidad a las hormonas mencionadas. A su vez, dado que los reportes disponibles en la literatura en relación a la acción de estas hormonas se basan principalmente en trabajos efectuados con embriones aislados de sus cubiertas, se desconoce si, de manera similar a lo observado en embriones, los niveles de dormición del producto cosechable (i.e. fruto completo) se asocian a diferencias en el contenido y/o sensibilidad a algunas de estas hormonas.

La posibilidad de conocer el efecto de la temperatura durante el almacenaje post-cosecha sobre la dinámica de salida de la dormición de los frutos de girasol resultará relevante en el diseño de estrategias que determinen una salida más rápida de la dormición y en consecuencia, una utilización anticipada de los mismos a nivel industrial. Por otro lado, el conocimiento de algunos mecanismos involucrados en esta respuesta, como por ejemplo, la contribución de las diferentes estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición, así como la sensibilidad a diferentes hormonas vegetales ante ambientes térmicos contrastantes luego de la cosecha, posibilitará explorar algunas de las bases fisiológicas del efecto de la temperatura sobre la salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha en esta especie.

En este contexto, los objetivos del presente capítulo son:

1. Estudiar el efecto de la temperatura de almacenaje en post-cosecha sobre los cambios en el nivel de dormición en frutos de girasol.
2. Estudiar el aporte relativo de las diferentes estructuras del fruto de girasol (pericarpio, cubierta seminal y embrión) en la determinación del nivel de dormición de los aquenios durante el almacenaje post-cosecha, y su relación con el ambiente térmico explorado por los frutos durante esa etapa.
3. Determinar, en forma preliminar, en qué medida los efectos observados en 1. están mediados por cambios (a) en la sensibilidad de los frutos al ABA, las GAs y el etileno, y (b) en el contenido de ABA en los embriones antes y durante la incubación.

Materiales y métodos

Material vegetal

La semilla utilizada en los experimentos del presente capítulo fue generada a partir de los experimentos de las campañas 2008-2009 y 2009-2010, desarrollados en el Capítulo 2. En estos experimentos, se produjo semilla del híbrido DK4045, seleccionado por presentar altos niveles de dormición a cosecha. El manejo del cultivo a campo, el momento de cosecha (i.e. cuando el contenido de humedad del grano fue del 11%) y el porcentaje de humedad hasta el cual se secaron los granos luego de la cosecha (i.e. 6%), se efectuó de igual manera que en la producción de semilla híbrida a nivel comercial.

Experimento 1: Exposición de los frutos a diferentes ambientes térmicos durante el almacenaje post-cosecha. Su relación con el patrón de salida de la dormición y la contribución de las diferentes estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición (Objetivos 1 y 2).

Experimento 1.1: Durante la campaña 2008-2009, cinco lotes de aquenios (lotes 1 a 5) provenientes de los diferentes ambientes térmicos durante el llenado de granos descritos en el capítulo 2, fueron almacenados a dos temperaturas contrastantes (5°C y 25°C) luego de la cosecha. La semilla denominada lote 1 y 2 en el presente capítulo corresponde a la semilla cosechada de los tratamientos con carpas durante el llenado, con temperaturas medias de 10 a 18 hs de 32.1 y 37.7°C (tratamientos testigo y alta temperatura, respectivamente, experimento 2, capítulo 2). Los lotes 3, 4 y 5 corresponden a la semilla cosechada de las fechas de siembra temprana (22/09/08), intermedia (22/10/08) y tardía (02/12/08), con temperaturas medias de 10 a 18 hs de 26.6, 26.3 y 23.8°C respectivamente (experimento 1, capítulo 2). Los detalles del ambiente térmico explorado en cada situación pueden observarse en los cuadros 2.1 y 2.2 y en las figuras 2.4 y 2.8 del capítulo 2.

Durante un período total de 90 días se tomaron muestras de aquenios provenientes de ambas temperaturas de almacenaje cada 15 días. Las muestras fueron sometidas a pruebas de germinación de aquenios (lotes 1 a 5) a 11°C y 25°C de incubación, y a pruebas de germinación de embriones (lotes 1, 2, 3 y 5) a 11°C de incubación (ver apartado “Pruebas de germinación”).

Experimento 1.2: Con el objetivo de evaluar qué proporción de la dormición observada en los lotes almacenados a diferentes ambientes térmicos era explicada por las distintas estructuras del fruto (embrión, cubierta seminal verdadera y pericarpio), se determinó el porcentaje de germinación a 11°C de los frutos completos (aquenios), de las semillas (fruto sin el pericarpio) y de los embriones (fruto sin el pericarpio ni la cubierta seminal verdadera) (Ver apartado “Pruebas de germinación”). Posteriormente, se calculó el porcentaje de la dormición explicado por el embrión (porcentaje de embriones dormidos), por la cubierta seminal verdadera (diferencia entre el porcentaje de semillas dormidas y el porcentaje de embriones dormidos) y por pericarpio (diferencia entre el porcentaje de frutos dormidos y el porcentaje de semillas dormidas). Estas observaciones se efectuaron para lotes de aquenios almacenados a 5°C y 25°C por 30, 60 y 90 días (provenientes del lote 3), ó 34, 57 y 70 días (provenientes de un lote de producción de la campaña 2009-2010, con el mismo híbrido y condiciones de manejo que los utilizados en esta tesis).

Experimento 1.3: Durante la campaña 2009-2010, se almacenaron muestras de aquenios a las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C (los mismos habían estado previamente almacenados por 12 meses a 5°C, provenientes de los ensayos de fecha de siembra intermedia de la campaña 2008-2009, correspondiente al experimento 1 descrito en el capítulo 2). A los 18 días de almacenaje se tomaron muestras de aquenios provenientes de cada temperatura de almacenaje, que fueron sometidas a una prueba de germinación a 15°C (ver apartado “Pruebas de germinación”). Este ensayo fue repetido un segundo año, durante la campaña 2010-2011, utilizando semilla proveniente de un lote de producción del mismo híbrido y condiciones de manejo que los utilizados en esta tesis.

Experimento 2: Exposición de los frutos a diferentes ambientes térmicos durante la etapa de almacenaje post-cosecha. Su relación con los cambios en la sensibilidad al ABA, GAs y etileno, con el contenido endógeno de ABA y con el patrón de salida de la dormición (Objetivo 3).

Experimento 2.1: Con el fin de evaluar si los efectos del ambiente térmico de almacenaje sobre los cambios en el nivel de dormición se relacionan con cambios en la sensibilidad de los frutos al ABA, GAs y etileno, se realizaron ensayos donde se evaluó el porcentaje de germinación de diferentes combinaciones de estructuras (aquenios, semillas y/o embriones), temperaturas y medios de incubación (Cuadro 3.1). Los medios de incubación consistieron en agua destilada o diferentes concentraciones de hormonas y sus respectivos inhibidores.

En un primer ensayo, luego de 60 días de almacenaje a 5°C y 25°C, se incubaron aquenios, semillas y embriones en los medios 1 a 7 (Cuadro 3.1), mientras que en un segundo ensayo, luego de 80 días de almacenaje a 5°C y 25°C, se incubaron aquenios y embriones en los medios 1, 8, 9 y 10 (Cuadro 3.1). En este experimento se utilizaron los frutos provenientes de los ensayos de fecha de siembra intermedia de la campaña 2008-2009 (experimento 1, capítulo 2).

Cuadro 3.1. Medios y temperaturas de incubación de aquenios, semillas y embriones almacenados a 5 y 25°C durante 60 días (medios 1 a 7) ú 80 días (medios 1, 8, 9 y 10).

#	Medio de incubación	Incubación a 11°C			Incubación a 25°C
		Aquenios	Semillas	Embriones	Aquenios
1	Agua	✓	✓	✓	✓
2	Agua+Fluridone 100 uM	✓	✓	✓	✓
3	Agua+Fluridone 100 uM+ABA 10 uM	✓	✓	✓	✓
4	Agua+Fluridone 100 uM+ABA 50 uM	✓	✓	✓	✓
5	Agua+Fluridone 100 uM+ABA 100 uM	✓	✓	✓	✓
6	Agua+Paclobutrazol 100 uM	✓	✓	✓	✓
7	Agua+Paclobutrazol 100 uM+GA3 10 uM	✓	✓	✓	✓
8	Agua+NBD 100 uM	✓		✓	
9	Agua+NBD 100 uM+etefón 0.1 ml en 1000 ml de agua	✓		✓	
10	Agua+NBD 100 uM+etefón 1 ml en 1000 ml de agua	✓		✓	

El fluridone y el paclobutrazol son inhibidores de la síntesis de ABA y GAs respectivamente. El NBD (2, 5-norbornadiene) se une de manera reversible al receptor del etileno y es un inhibidor competitivo de la acción de esta hormona. La inclusión de estos inhibidores en el medio de incubación tuvo como objetivo evitar la síntesis y/o acción de las hormonas ABA, GAs y etileno durante el período de incubación, de manera de evaluar la sensibilidad a cantidades conocidas de estas hormonas agregadas en forma exógena.

Experimento 2.2: Con el objetivo de evaluar si las diferencias en el nivel de dormición de los aquenios almacenados a 5 y 25°C se asociaban a diferencias en el contenido endógeno de ABA antes y durante la incubación, frutos que habían sido almacenados

durante 12 meses a 5°C y a 25°C fueron incubados durante 15 hs y 24 hs (Exp. 2.2.a) o 24 hs (Exp. 2.2.b) a 10°C. Los frutos secos (0 hs de incubación) y los incubados por los períodos mencionados, fueron colocados en nitrógeno líquido durante 30 segundos y luego guardados en un freezer a -80°C. Una vez liofilizadas las muestras, las cubiertas (pericarpio y cubierta seminal) fueron removidas y descartadas, y se molieron en forma separada los ejes embrionarios y los cotiledones para realizar la extracción de ABA. Las determinaciones de ABA se realizaron por radioinmunoensayo (Steinbach *et al.*, 1995), en 3 repeticiones de 25 ejes embrionarios y 25 pares de cotiledones molidos a los que se agregó agua (24 µl por mg de peso seco) para extraer el ABA. Los valores se expresan en picogramos de ABA por miligramo de peso seco (pg ABA/ mg peso seco). A su vez, se determinó el porcentaje de germinación a 10 °C de frutos y embriones provenientes de los mismos lotes almacenados a 5°C y 25°C. En este experimento se utilizaron los frutos provenientes de los ensayos de fecha de siembra temprana e intermedia de la campaña 2008-2009 (descritos en el experimento 1, capítulo 2) para efectuar los experimentos 2.2.a y 2.2.b, respectivamente.

Pruebas de germinación

Cuatro (Exp. 1.1, 1.2, 1.3 y 2.1) o tres (Exp. 2.2. y medios de incubación 6 a 10 más su correspondiente control del Exp. 2.1) repeticiones de 25 aquenios, semillas y/o embriones (según corresponda) fueron colocados en cajas de Petri de 9 cm de diámetro sobre dos discos de papel de filtro conteniendo 5 ml de agua destilada ó los medios de incubación hormonales detallados previamente.

En los tratamientos en los que se removió el pericarpio, el mismo fue cortado en la región micropilar, cortando sólo el pericarpio y evitando dañar el embrión. En los tratamientos en los que se removió además la cubierta seminal verdadera, las semillas sin el pericarpio fueron colocadas durante dos horas en cajas de Petri sobre un disco de papel de filtro conteniendo 3 ml de agua destilada o los medios de incubación hormonales detallados previamente, con el objetivo de hidratar la cubierta seminal verdadera previo a su separación del embrión, evitando así dañarlo.

Las cajas de Petri conteniendo los aquenios fueron incubadas a las temperaturas de 10°C, 11°C, 15°C y/o 25°C (según corresponda a cada experimento), y las cajas conteniendo las semillas y los embriones fueron incubadas a 11°C. Todas las cajas se mantuvieron en cámaras con una variación de temperatura de ± 1 °C por un lapso de 20 días. A los 20 días desde el comienzo de la incubación, se efectuó un recuento de germinación, siendo la visualización de la protrusión de la radícula el criterio para determinar la germinación de los aquenios, y la visualización de la elongación de la radícula por 3 mm el criterio para determinar la germinación de semillas y embriones. Todos los frutos, semillas y embriones que durante la incubación presentaron síntomas de pudrición, o coloración y aspecto diferente al resto eran descartados de las pruebas, hubiesen germinado o no (los valores de estructuras no viables en todos los casos fueron menores al 10%).

Análisis estadísticos

Los resultados de los experimentos a campo fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), y test de Tukey como test de separación de medias. En algunos

casos, por la falta de cumplimiento de homogeneidad de varianzas (Fig. 3.10, 3.11, 3.15, 3.18, 3.19, 3.21, 3.24), se utilizó una función de heterocedasticidad mediante la aplicación de modelos lineales generales y mixtos. Las evaluaciones del contenido de ABA en distintos momentos de incubación fueron analizadas mediante modelos lineales generales y mixtos para medidas repetidas en el tiempo. En todos los casos se utilizó el software InfoStat (InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), asistido por R (R version 2.11.1 Copyright 2010. The R Foundation for Statistical Computing), y un nivel de significancia de 5%.

Resultados

Efectos del ambiente térmico durante el almacenaje post-cosecha y de las estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición

Experimento 1: Exposición de los frutos a diferentes ambientes térmicos durante la etapa de almacenaje post-cosecha. Su relación con el patrón de salida de la dormición y el efecto de las estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición (Objetivos 1 y 2).

Experimento 1.1.

El porcentaje de germinación a cosecha de los frutos provenientes del lote 1 incubados a 25°C fue casi nulo (Fig. 3.1), evidenciando un alto nivel de dormición. A partir del momento de cosecha, los frutos comenzaron a disminuir su nivel de dormición con una dinámica que dependió de la temperatura a la que fueron almacenados. Así, los frutos almacenados a mayor temperatura (25°C), que comenzaron a germinar a los 15 días post cosecha, alcanzaron niveles máximos de germinación (100%) a los 45 días post-cosecha, con una salida de la dormición significativamente más rápida que aquellos provenientes del almacenaje a menor temperatura (5°C), que recién alcanzaron máximos niveles de germinación a los 60 días post-cosecha. Los frutos del lote 2 también evidenciaron altos niveles de dormición a cosecha (Fig. 3.2), y una dinámica de salida de la dormición más rápida cuando fueron almacenados a 25°C en comparación a lo observado en aquellos almacenados a 5°C. Sin embargo, estas diferencias observadas en el nivel de dormición entre ambas temperaturas de almacenaje estuvieron también asociadas a la temperatura a la que los frutos habían estado expuestos durante el llenado. Así, a los 90 días post-cosecha por ejemplo, los frutos del lote 1 (expuestos a menor temperatura durante el llenado) alcanzaron máximos niveles de germinación para ambas temperaturas de almacenaje (Fig. 3.1), mientras que los frutos del lote 2 (expuestos a mayor temperatura durante el llenado) aún presentaban diferencias en el nivel de dormición entre temperaturas de almacenaje cercanas al 50% (Fig. 3.2).

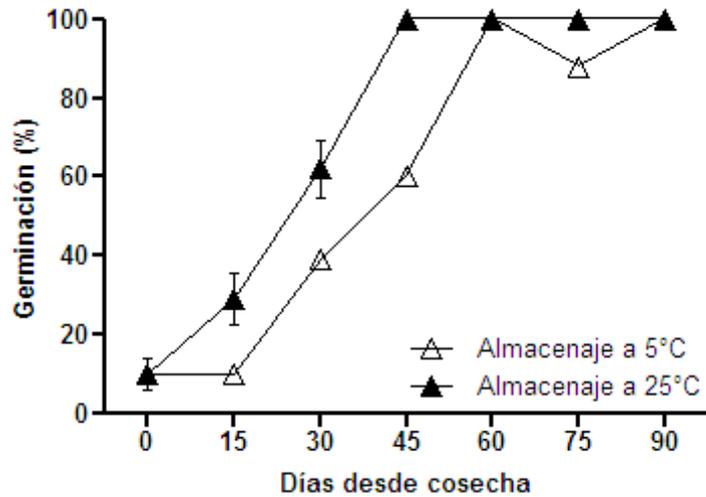


Fig. 3.1. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 1 (tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado, ver exp. 2, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.

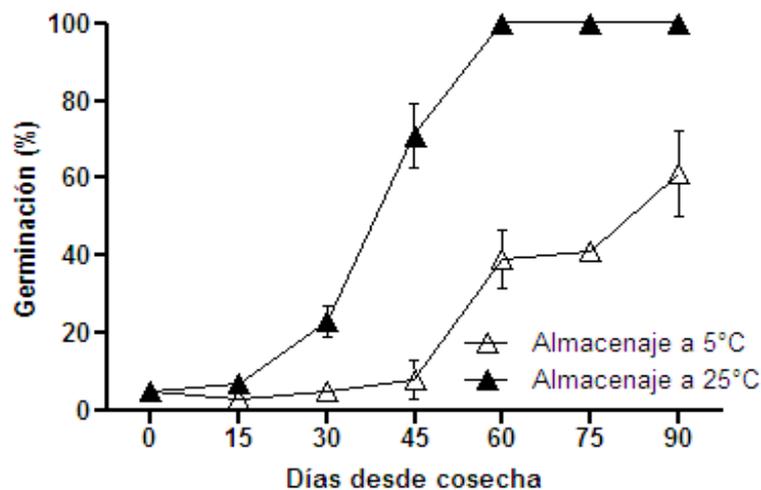


Fig. 3.2. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 2 (tratamiento de mayor temperatura durante el llenado, ver exp. 2, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.

Una respuesta similar a los lotes anteriores fue observada en los frutos del lote 4 (Fig. 3.3). A cosecha, los frutos presentaron altos niveles de dormición, pero ese nivel de dormición fue disminuyendo progresivamente con una dinámica que dependió de la temperatura de almacenaje. Nuevamente, los frutos almacenados a mayor temperatura (25°C) presentaron una dinámica de salida de la dormición más rápida que aquellos almacenados a menor temperatura (5°C), alcanzando valores máximos de germinación a los 60 y 90 días post-cosecha, respectivamente.

Esta respuesta diferencial en relación a la salida de la dormición según la temperatura de almacenaje, no se observó en la misma magnitud en el lote 3 (proveniente de la fecha de siembra temprana) (Fig. 3.4) y lote 5 (proveniente de la fecha de siembra tardía) (Fig. 3.5), donde los aquenios presentaron un patrón de salida de la dormición similar para ambas temperaturas de almacenaje cuando fueron

incubados a 25°C. Sin embargo, en estos dos lotes (3 y 5), las diferencias en la tasa de salida de la dormición en función de la temperatura de almacenaje se expresaron claramente en los embriones incubados a una temperatura menor (11°C) (Fig. 3.6 y 3.7). Por ejemplo, los embriones del lote 3 almacenados a 25°C, alcanzaron valores máximos de germinación a los 45 días de almacenaje, significativamente más rápido que aquellos almacenados a 5°C, que aún a los 90 días luego de la cosecha no alcanzaron el 100% de germinación (Fig. 3.6). De igual manera, en el lote 5, los embriones provenientes del almacenaje a 25°C presentaron una dinámica de salida de la dormición más rápida que los provenientes del almacenaje a 5°C, que seguían presentando bajos porcentajes de germinación (menores a 40 %) aún luego de 90 días de almacenaje (Fig. 3.7). Una respuesta similar por parte de los embriones incubados a 11°C se observó en los dos lotes restantes (lotes 1 y 2), donde nuevamente, aquellos embriones provenientes del almacenaje a 25°C presentaron una dinámica de salida de la dormición más rápida que aquellos provenientes del almacenaje a 5°C (Fig. 3.8 y 3.9).

Cuando se evaluó el porcentaje de germinación a 11°C de incubación de los aquenios del lote 3 (fecha de siembra temprana), y de los lotes 1 y 2 (menor y mayor temperatura durante el llenado respectivamente), se observaron porcentajes de germinación casi nulos, no superando en ningún caso el 20% de germinación (Fig. 3.6, 3.8 y 3.9). Sin embargo, los aquenios del lote 5 (fecha de siembra tardía) germinaron en mayor porcentaje que los demás lotes, y presentaron amplias diferencias en función de la temperatura de almacenaje. Así, mientras que los frutos almacenados a 25°C presentaron niveles máximos de germinación luego de 75 días de almacenaje, los porcentajes de germinación para frutos almacenados a 5°C no superaron el 10 % de germinación durante todo el período de almacenaje evaluado (Fig. 3.7).

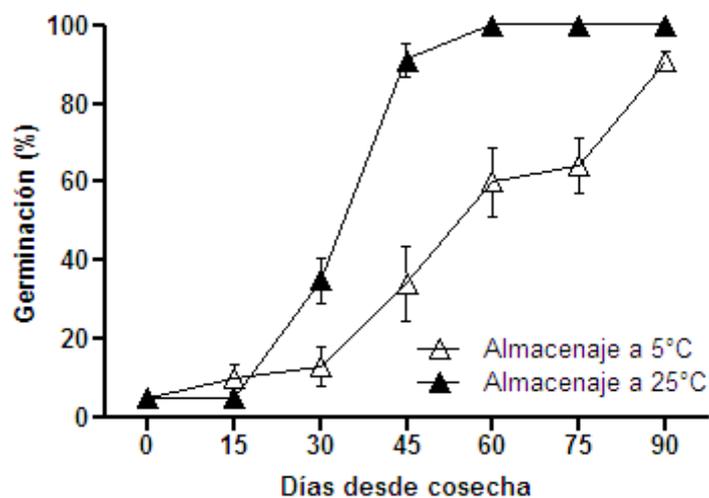


Fig. 3.3. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 4 (fecha de siembra intermedia, ver exp. 1, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.

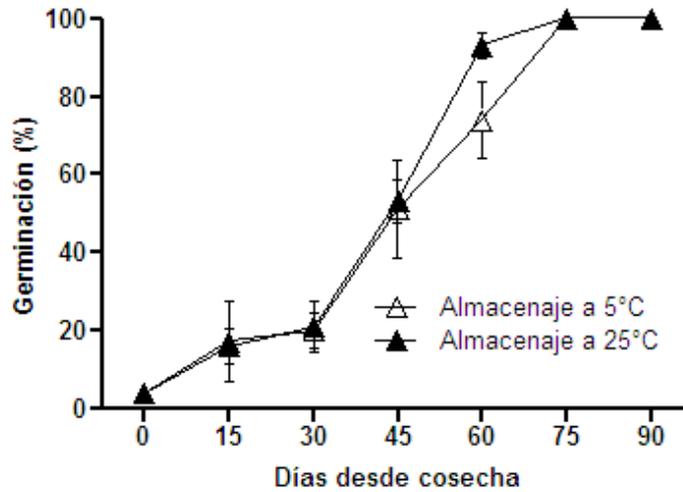


Fig. 3.4. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 3 (fecha de siembra temprana, ver exp. 1, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.

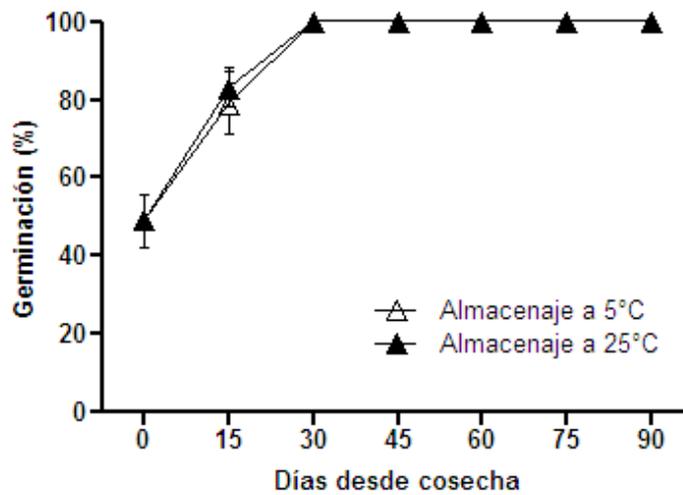


Fig. 3.5. Porcentaje de germinación a 25°C de aquenios del lote 5 (fecha de siembra tardía, ver exp. 1, cap. 2) en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.

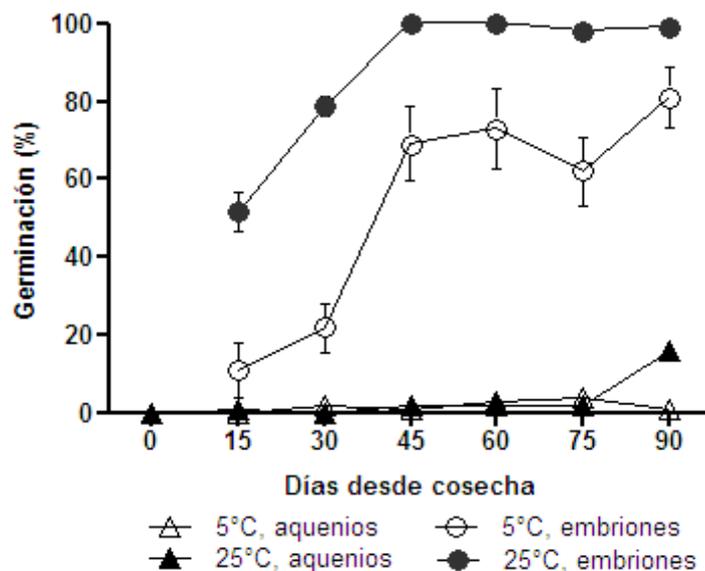


Fig. 3.6. Porcentaje de germinación a 11°C de achenes (triángulos) y embriones (círculos) del lote 3 (fecha de siembra temprana, ver exp. 1, cap. 2), en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y a 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.

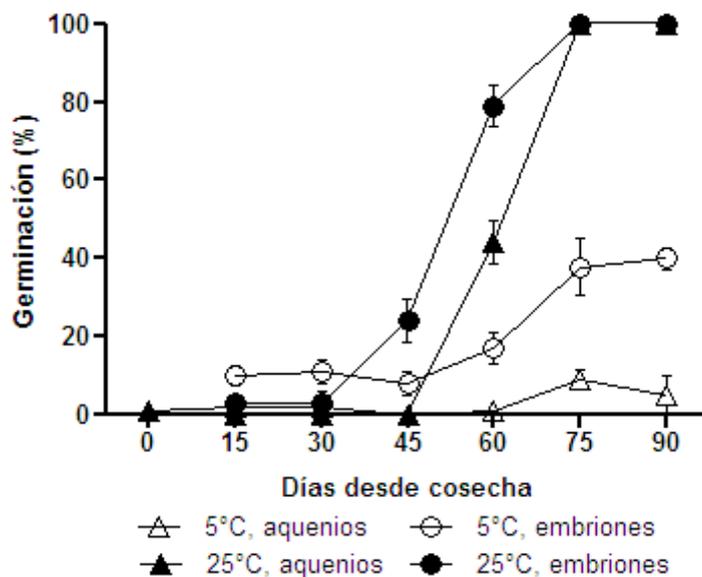


Fig. 3.7. Porcentaje de germinación a 11°C de achenes (triángulos) y embriones (círculos) del lote 5 (ensayo de fecha de siembra tardía, ver exp. 1, cap. 2), en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y a 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.

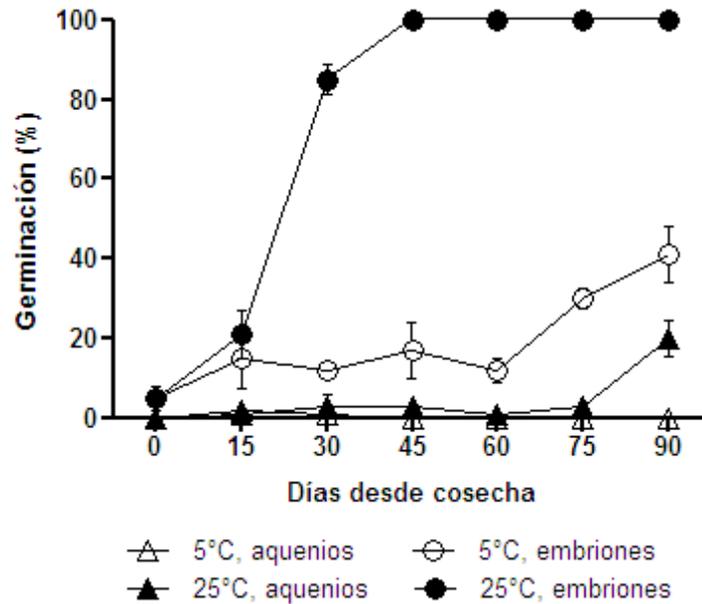


Fig. 3.8. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios (triángulos) y embriones (círculos) del lote 1 (tratamiento testigo de menor temperatura durante el llenado, ver exp. 2, cap. 2), en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y a 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.

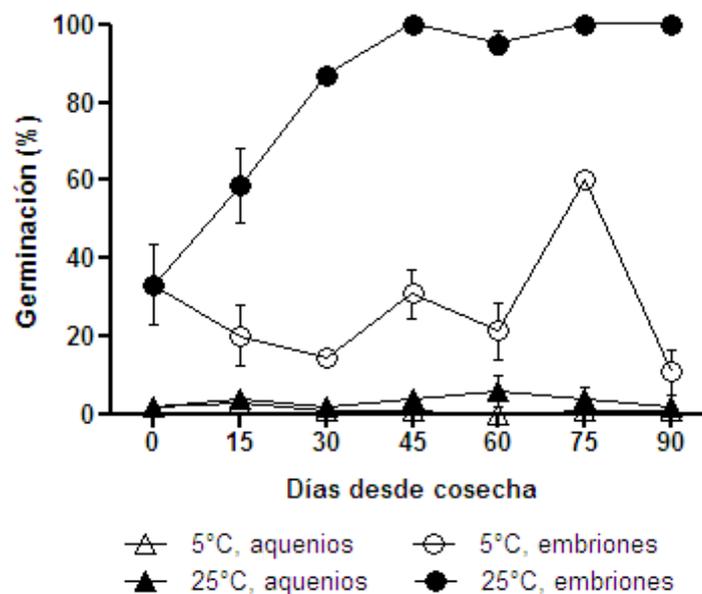


Fig. 3.9. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios (triángulos) y embriones (círculos) del lote 2 (tratamiento de mayor temperatura durante el llenado, ver exp. 2, cap. 2), en función de los días desde cosecha, para frutos almacenados a 5°C (símbolos vacíos) y a 25°C (símbolos llenos). Las barras verticales indican error estándar.

Experimento 1.2.

Durante la campaña 2008-09 los aquenios incubados a 11°C presentaron porcentajes de germinación casi nulos durante todo el período de almacenaje evaluado, indicando niveles de dormición máximos (Fig. 3.10). Recién a los 90 días de almacenaje, y sólo los aquenios almacenados a 25°C, germinaron en aproximadamente un 20% (Fig. 3.10). A su vez, los embriones y semillas provenientes de los aquenios almacenados a 25°C presentaron mayores porcentajes de germinación que los del

almacenaje a 5°C en los distintos momentos de almacenaje evaluados (en algún caso esta diferencia no resultó significativa) (Fig. 3.10). Un comportamiento similar fue observado en la campaña 2009-10 (Fig. 3.11). En esta campaña, los aquenios también presentaron porcentajes de germinación prácticamente nulos durante todo el período de almacenaje, mientras que los embriones y las semillas presentaron cambios diferenciales en el nivel de dormición de acuerdo a la temperatura de almacenaje. Nuevamente, los embriones y semillas provenientes de aquenios almacenados a 25°C presentaron en general mayores porcentajes de germinación que los provenientes de aquenios almacenados a 5°C.

En ambas campañas y para los tres momentos post-cosecha evaluados, la remoción del pericarpio determinó aumentos en el porcentaje de germinación de las semillas en relación a los porcentajes de germinación observados en el fruto completo, aunque en algunos casos ese aumento no fue estadísticamente significativo (Fig. 3.10 y 3.11). Asimismo, la remoción de la cubierta seminal verdadera también se asoció a aumentos en la germinación de los embriones resultantes (Fig. 3.10 y 3.11).

Cuando se calculó el porcentaje de dormición explicado por dormición embrionaria y por dormición impuesta por las cubiertas (cubierta seminal verdadera y pericarpio), de manera similar a lo observado en el experimento 1.1., la dormición embrionaria fue mayor en los aquenios provenientes del almacenaje a 5°C que la observada en aquellos provenientes del almacenaje a 25°C (Fig. 3.12 y 3.13). En cuanto a la dormición impuesta por las cubiertas, tanto la cubierta seminal verdadera como el pericarpio explicaron parte de la dormición observada. Sin embargo, en la campaña 2008-2009, el componente de dormición impuesta por la cubierta seminal verdadera tuvo mayor relevancia que el pericarpio, mientras que durante la campaña 2009-2010 fue de manera inversa. Por otro lado, en ambas campañas se pudo observar una disminución de la dormición explicada por el embrión y un aumento paulatino de la dormición explicada por las cubiertas a medida que transcurrió el tiempo de almacenaje (Fig. 3.12 y 3.13).

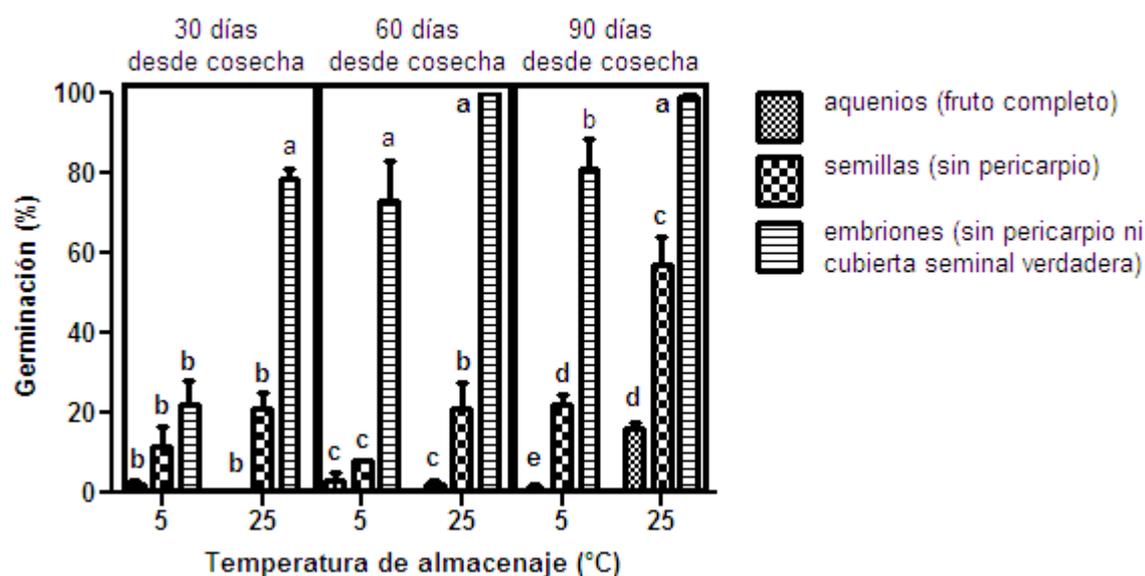


Fig. 3.10. Porcentaje de germinación a 11°C de aquenios, semillas y embriones cosechados durante la campaña 2008-09 luego de ser almacenadas durante 30, 60 y 90 días a 5°C ó 25°C. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, para cada uno de los momentos desde cosecha evaluados. Las barras de error indican error estándar.

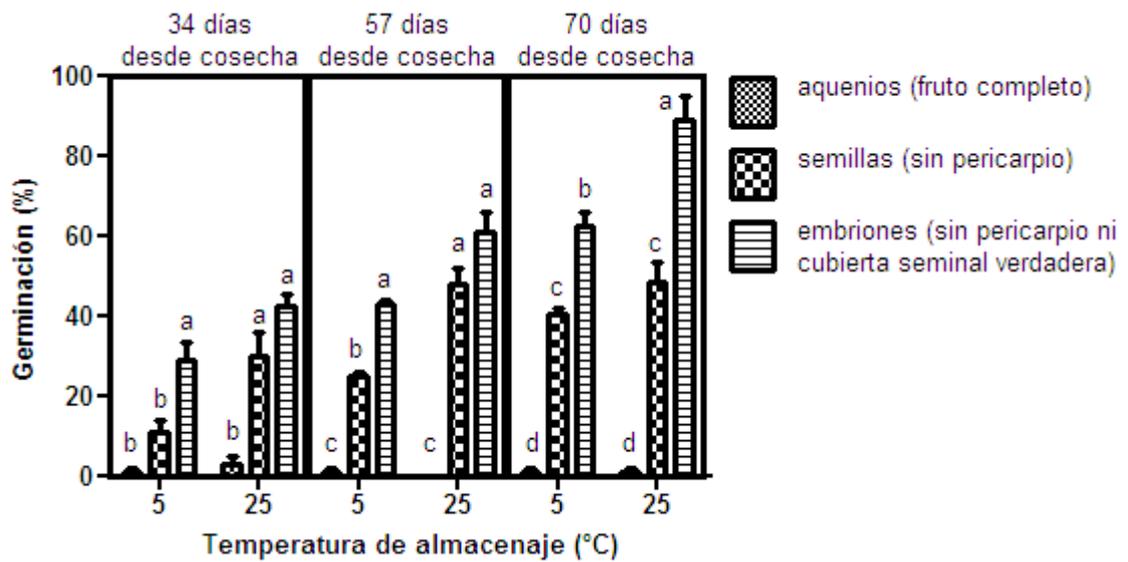


Fig. 3.11. Porcentaje de germinación a 11°C de achenos, semillas y embriones cosechados durante la campaña 2009-10 luego de ser almacenadas durante 34, 57 y 70 días a 5°C ó 25°C. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, para cada uno de los momentos desde cosecha evaluados. Las barras de error indican error estándar.

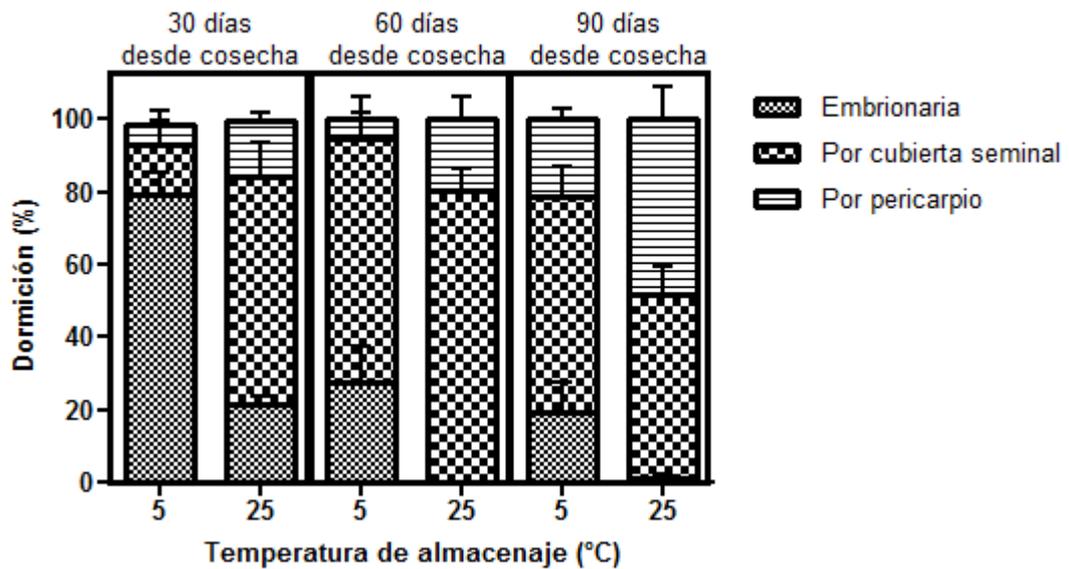


Fig. 3.12. Porcentaje de la dormición observada en los achenos incubados a 11°C explicada por dormición embrionaria, por dormición impuesta por la cubierta seminal verdadera o por dormición impuesta por pericarpio. Valores calculados en base a los porcentajes de germinación de achenos, semillas y embriones de la Fig. 3.10. Las barras de error indican error estándar.

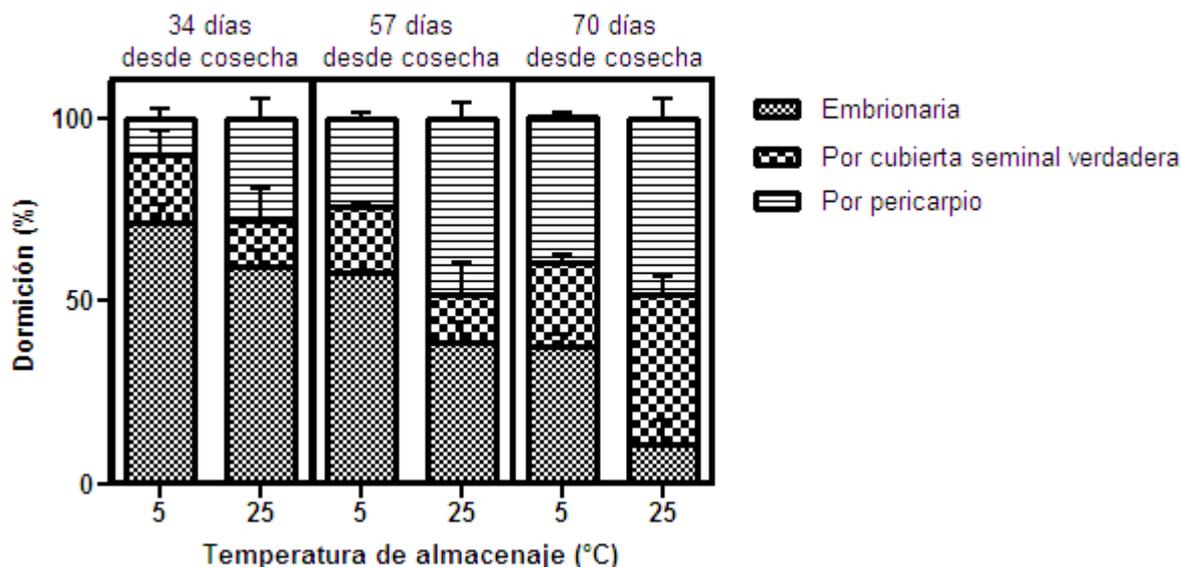


Fig. 3.13. Porcentaje de la dormición observada en los agueros incubados a 11°C explicada por dormición embrionaria, por dormición impuesta por la cubierta seminal verdadera o por dormición impuesta por pericarpio. Valores calculados en base a los porcentajes de germinación de agueros, semillas y embriones de la Fig. 3.11. Las barras de error indican error estándar.

Experimento 1.3.

Luego de haber sido almacenados por doce meses a 5°C, los agueros incubados a 15°C aún presentaban un porcentaje de germinación inferior al 70% (Fig. 3.14). El almacenaje de este lote a las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C durante 18 días, determinó cambios diferenciales en el porcentaje de germinación final ($p < 0.0001$) y en la cantidad de días hasta alcanzar el 50% de germinación ($p < 0.0001$) (Fig. 3.15 y 3.16). En relación al porcentaje de germinación final, los agueros provenientes del almacenaje a mayor temperatura (25°C y 30°C) y el de aquellos almacenados a 10°C, presentaron valores significativamente superiores a los obtenidos tanto previo a su almacenaje, como luego de haber sido almacenados a 5, 15, y 20 °C; a su vez el porcentaje de germinación de estos últimos no difirió significativamente del observado previo a su almacenaje a esas temperaturas (Fig. 3.15). Con respecto al tiempo al 50% de germinación, los agueros provenientes de las distintas temperaturas de almacenaje alcanzaron este valor en menor cantidad de días que los necesarios previo a ser almacenados a esas temperaturas (Fig. 3.16), excepto aquellos almacenados a 5°C. Los agueros almacenados a 5°C alcanzaron el 50% de germinación en mayor cantidad de días que los almacenados a 10 y 30°C. No existieron diferencias significativas en este parámetro para los agueros almacenados a 10, 15, 20, 25 y 30°C (Fig. 3.16).

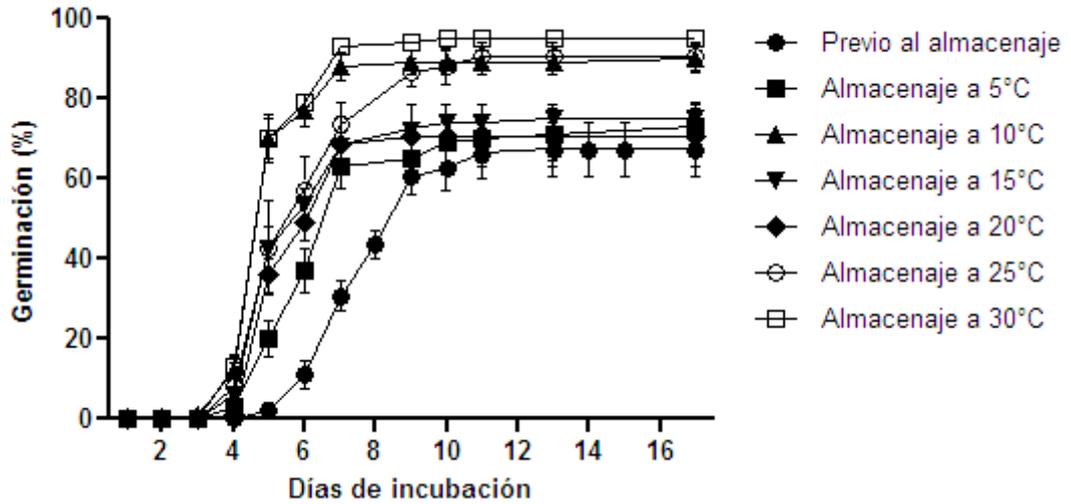


Fig. 3.14. Dinámica de la germinación de achenes en función de los días de incubación a 15°C previo a su almacenaje y luego de ser almacenados durante 18 días a 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C y 30°C. Las barras verticales indican error estándar.

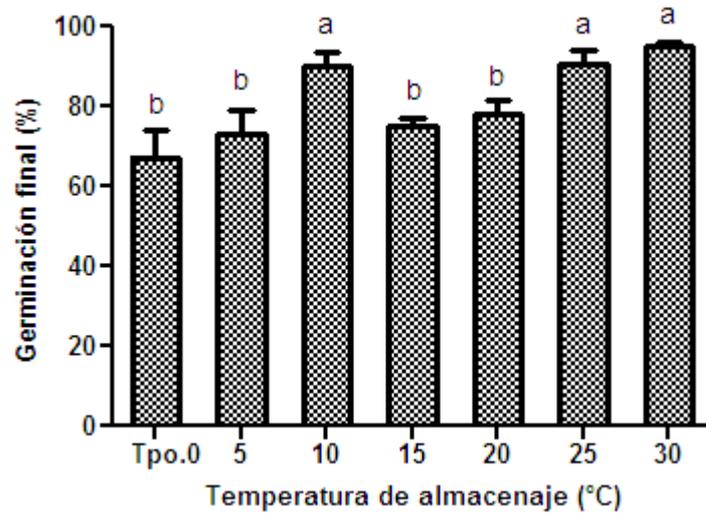


Fig. 3.15. Porcentaje de germinación final de achenes incubados a 15 °C previo a su almacenaje (Tpo. 0), y luego de ser almacenados durante 18 días a 5, 10, 15, 20, 25 ó 30°C. Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

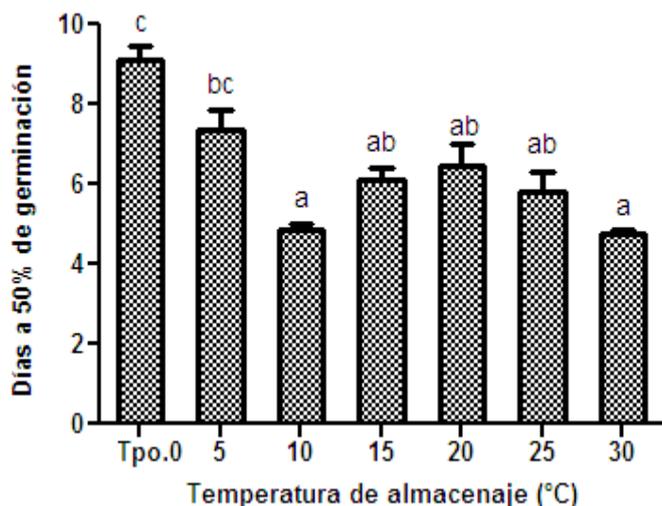


Fig. 3.16. Días a 50% de germinación de aquenios incubados a 15°C previo a su almacenaje (Tpo. 0), y luego de ser almacenados durante 18 días a 5, 10, 15, 20, 25 ó 30°C. Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Este experimento fue repetido un segundo año, en el que se obtuvieron resultados similares (Ver Anexo).

Experimento 2: Sensibilidad al ABA, GAs y etileno y contenido endógeno de ABA en función del ambiente térmico durante el almacenaje post-cosecha y su relación con el patrón de salida de la dormición (Objetivo 3).

Experimento 2.1.

Sensibilidad al ABA en función de la temperatura de almacenaje y su relación con el nivel de dormición

-Aquenios:

Incubación a 25°C. El porcentaje de germinación en agua de los aquenios almacenados a 5°C fue significativamente menor al observado en los almacenados a 25°C (Fig. 3.17). El agregado de fluridone al medio de incubación aumentó significativamente el porcentaje de germinación de los aquenios almacenados a 5°C, sin embargo, no condujo a cambios significativos en el porcentaje de germinación de los almacenados a 25°C, los cuales ya presentaban altos valores de germinación en agua. El agregado de ABA 10 uM al medio de incubación disminuyó significativamente el porcentaje de germinación de los aquenios almacenados a 5°C en relación a los valores observados para aquenios incubados con fluridone, mientras que no produjo cambios en el porcentaje de germinación de los aquenios almacenados a 25°C. Finalmente, el agregado de ABA 50 uM y 100 uM al medio de incubación condujo a disminuciones significativas del porcentaje de germinación tanto de los aquenios almacenados a 5°C como a 25°C (Fig. 3.17).

Incubación a 11°C. A diferencia de lo observado en los aquenios incubados a 25°C, la incubación a 11°C estuvo asociada a valores de germinación casi nulos para todos los tratamientos, salvo la germinación en agua y fluridone provenientes del almacenaje a

25°C que presentaron valores de germinación de 9% y 13% respectivamente (datos no presentados). Los bajos valores observados no permitieron la comparación entre tratamientos.

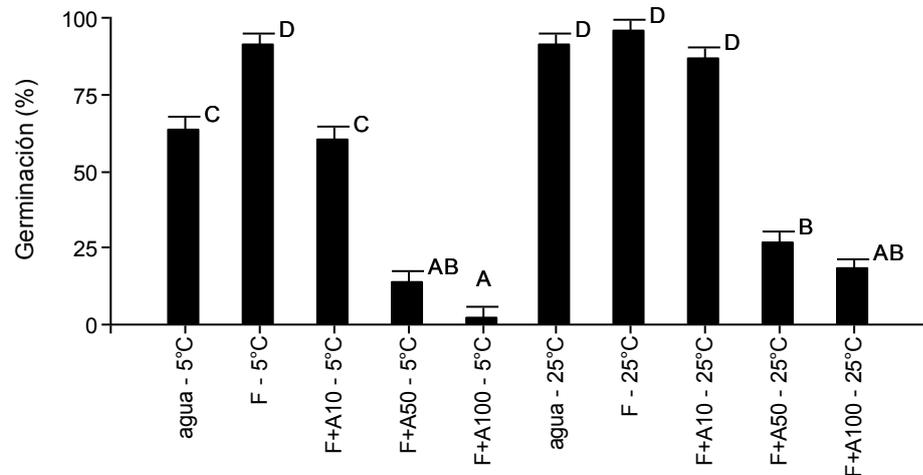


Fig. 3.17. Porcentaje de germinación de achenes almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 25°C en agua, fluridone 100uM (F), fluridone 100uM+ABA10uM (F+A10), fluridone 100uM+ABA50uM (F+A50) y fluridone 100uM+ABA100uM (F+A100). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

-Semillas:

Incubación a 11°C. El porcentaje de germinación en agua de las semillas provenientes de achenes almacenados a 5°C fue menor que el observado para semillas de achenes almacenados a 25°C (Fig. 3.18). El agregado de fluridone al medio de incubación aumentó el porcentaje de germinación de las semillas del almacenaje a 5°C, mientras que no lo aumentó en aquellas provenientes del almacenaje a 25°C (por el contrario, se observó una disminución en su porcentaje de germinación). El agregado de ABA 10 uM al medio de incubación disminuyó el porcentaje de germinación de las semillas del almacenaje a 5°C en mayor medida que las del almacenaje a 25°C respecto al medio control (fluridone). Mayores concentraciones de ABA (50 y 100 uM) se asociaron a disminuciones del porcentaje de germinación a valores prácticamente nulos (Fig. 3.18).

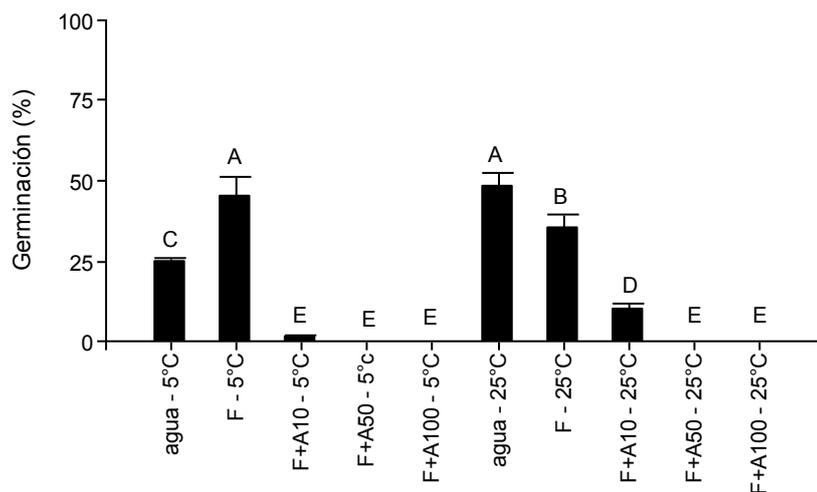


Fig. 3.18. Porcentaje de germinación de semillas provenientes de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubadas a 11°C en agua, fluridone 100uM (F), fluridone 100uM+ABA10uM (F+A10), fluridone 100uM+ABA50uM (F+A50) y fluridone 100uM+ABA100uM (F+A100). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

-Embriones:

Incubación a 11°C. El porcentaje de germinación en agua de los embriones provenientes de aquenios almacenados a 5°C fue menor que el observado en aquellos almacenados a 25°C (Fig. 3.19). El agregado de fluridone al medio de incubación aumentó el porcentaje de germinación de los embriones del almacenaje a 5°C (Fig. 3.19), y no produjo efectos en los embriones del almacenaje a 25°C, al igual que lo observado previamente en los aquenios. El agregado de ABA 10 uM al medio de incubación determinó una disminución significativa del porcentaje de germinación de los embriones tanto del almacenaje a 5°C como 25°C. Mayores concentraciones de ABA en el medio de incubación (50 uM y 100 uM) determinaron niveles prácticamente nulos de germinación en ambos tratamientos (Fig. 3.19).

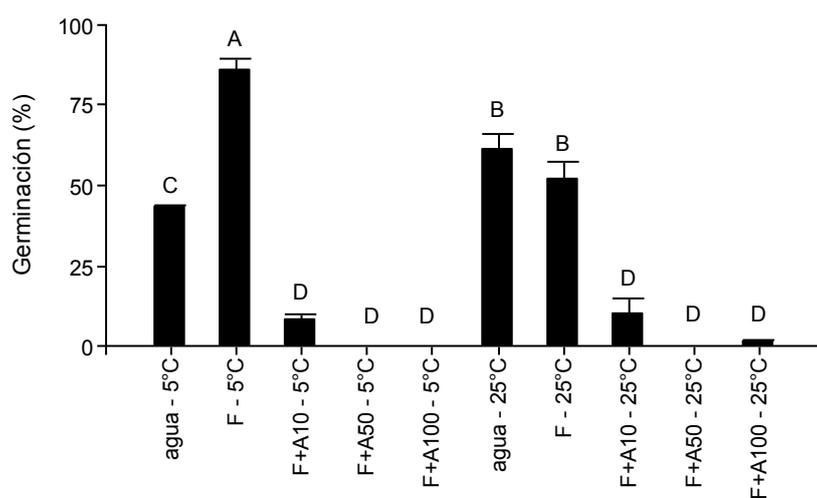


Fig. 3.19. Porcentaje de germinación de embriones provenientes de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 11°C en agua, fluridone 100uM (F), fluridone 100uM+ABA10uM (F+A10), fluridone 100uM+ABA50uM (F+A50) y fluridone 100uM+ABA100uM (F+A100). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Sensibilidad a GAs en función de la temperatura de almacenaje y su relación con el nivel de dormición

-Aqueños:

Incubación a 25°C. El porcentaje de germinación en agua de los aqueños almacenados a 5°C fue menor que el observado en los almacenados a 25°C (Fig. 3.20). El agregado de paclobutrazol al medio de incubación produjo una disminución significativa del porcentaje de germinación de los aqueños almacenados a 25°C, mientras que incrementó el de los almacenados a 5°C. El agregado de GAs 10 uM al medio de incubación no produjo diferencias significativas en el porcentaje de germinación de los aqueños almacenados a 5°C respecto al medio control (paclobutrazol). Por el contrario, para aqueños almacenados a 25°C, el agregado del mismo nivel de GAs al medio de incubación aumentó significativamente el porcentaje de germinación (Fig. 3.20).

Incubación a 11°C. A diferencia de lo observado en los aqueños incubados a 25°C, la incubación a 11°C estuvo asociada a valores de germinación prácticamente nulos para todos los tratamientos, salvo para aqueños almacenados a 25°C incubados en paclobutrazol + GA 10 uM que presentaron un valor de germinación de 22%. Los bajos valores observados no permitieron la comparación entre tratamientos (datos no presentados).

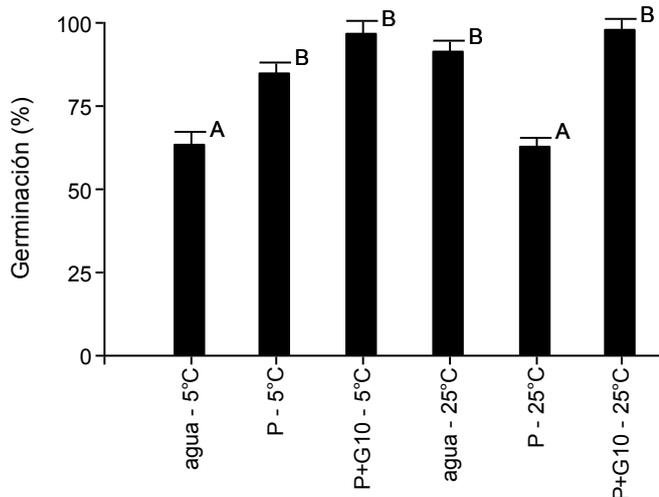


Fig. 3.20. Porcentaje de germinación de aqueños almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 25°C en agua, paclobutrazol 100uM (P) y paclobutrazol 100uM + GAs10uM (P+G10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

-Semillas:

Incubación a 11°C. Las semillas provenientes de aqueños almacenados a 5°C presentaron menor porcentaje de germinación que aquellas provenientes de aqueños almacenados a 25°C al ser incubadas en agua (Fig. 3.21). Cuando se agregó paclobutrazol al medio de incubación, las semillas de aqueños almacenados a 5°C disminuyeron el porcentaje de germinación respecto al medio conteniendo sólo agua, pero esta disminución no resultó significativa. Por el contrario, y al igual que para los aqueños del almacenaje a 25°C, las semillas de aqueños almacenados a 25°C disminuyeron significativamente su porcentaje de germinación ante el agregado de paclobutrazol. Por otro lado, al igual que lo observado en los aqueños, el agregado de

GAs al medio conteniendo paclobutrazol no condujo a diferencias en el porcentaje de germinación de las semillas de aquenios almacenados a 5°C, mientras que aumentó significativamente el porcentaje de germinación de las semillas de aquenios almacenados a 25°C (Fig. 3.21).

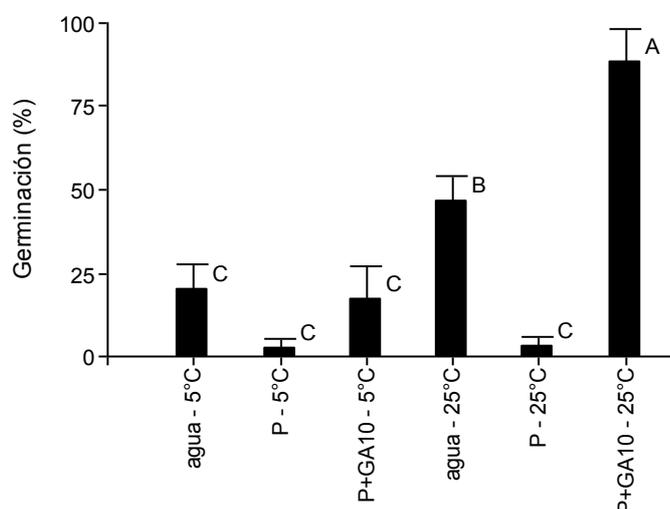


Fig. 3.21. Porcentaje de germinación de semillas provenientes de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubadas a 11°C en agua, paclobutrazol 100uM (P) y paclobutrazol 100uM + GA 10uM (P+G10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

-Embriones:

Incubación a 11°C. Los embriones provenientes de aquenios almacenados a 5°C germinaron en menor porcentaje que aquellos provenientes de aquenios almacenados a 25°C, sin embargo esta diferencia no resultó significativa (Fig. 3.22). Cuando se agregó paclobutrazol al medio de incubación, al igual que lo ocurrido en los aquenios y semillas, los embriones del almacenaje a 5°C no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación respecto al medio conteniendo sólo agua. Sin embargo, y al igual que para los aquenios y semillas, los embriones del almacenaje a 25°C disminuyeron significativamente su porcentaje de germinación ante la inclusión de paclobutrazol. El agregado de GAs al medio conteniendo paclobutrazol, condujo a aumentos significativos en el porcentaje de germinación tanto de los embriones de aquenios almacenados a 5°C como de los almacenados a 25°C. (Fig. 3.22).

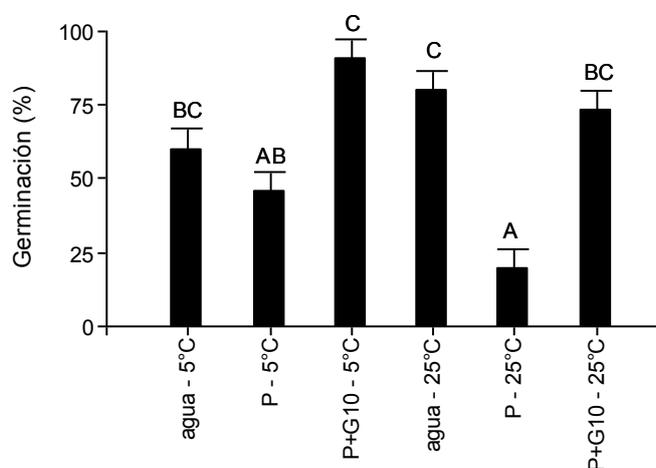


Fig. 3.22. Porcentaje de germinación de embriones provenientes de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 11°C en agua, paclobutrazol 100uM (P) y paclobutrazol 100uM + GAs10uM (P+G10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Sensibilidad a etileno en función de la temperatura de almacenaje y su relación con el nivel de dormición

-Aquenios:

Incubación a 11°C. Los aquenios almacenados a 5°C y 25°C presentaron bajos porcentajes de germinación cuando fueron incubados en agua (Fig. 3.23). El agregado de NBD al medio de incubación no produjo diferencias significativas respecto a la germinación en agua de los aquenios almacenados a 5°C y 25°C. Cuando se agregó etefón al medio de incubación, los porcentajes de germinación aumentaron significativamente a valores cercanos al 90% para los aquenios almacenados a ambas temperaturas. Esta respuesta se saturó con la menor concentración de etefón utilizada.

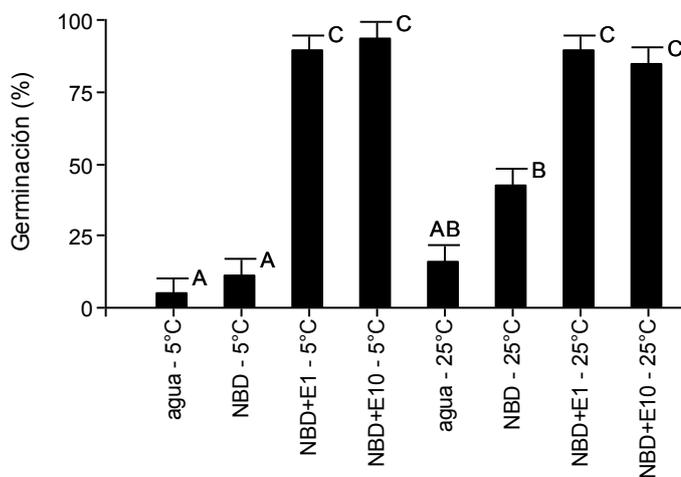


Fig. 3.23. Porcentaje de germinación de aquenios almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 11°C en agua, NBD 100uM, NBD 100uM+etefón 0.1 ml/L (NBD+E1) y NBD 100uM+etefón 1 ml/L (NBD+E10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

-Embriones:

Incubación a 11°C. El porcentaje de germinación en agua de los embriones provenientes de aquenios almacenados a 5°C fue significativamente menor que el observado en los embriones provenientes de aquenios almacenados a 25°C (Fig. 3.24).

Al igual que lo observado en los aquenios, el agregado de NBD al medio de incubación no produjo diferencias significativas respecto a la germinación en agua para los embriones de aquenios almacenados a ambas temperaturas. Cuando se agregó etefón al medio de incubación, al igual que lo observado para los aquenios, los embriones del almacenaje a 5°C aumentaron significativamente su porcentaje de germinación. Este aumento no se observó en los embriones del almacenaje a 25°C debido a que ya presentaban altos porcentajes de germinación previo al agregado de etefón.

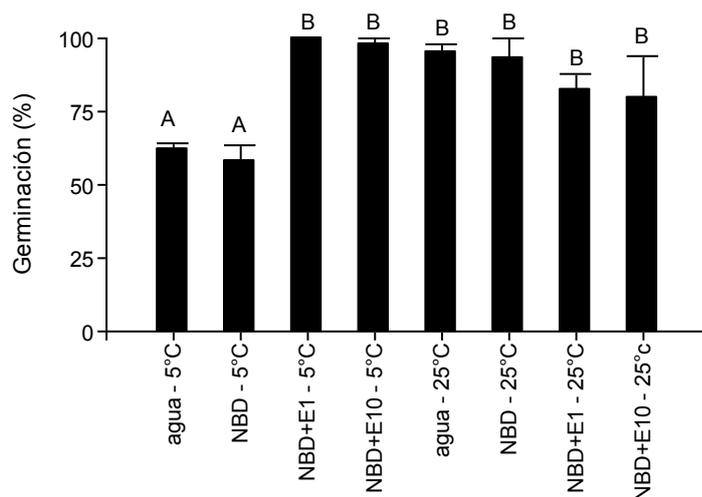


Fig. 3.24. Porcentaje de germinación de embriones extraídos de achenes almacenados a 5°C y 25°C, incubados a 11°C en agua, NBD 100uM, NBD 100uM+etefón 0.1 ml/L (NBD+E1) y NBD 100uM+etefón 1 ml/L (NBD+E10). Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Experimento 2.2.

Contenido de ABA en los embriones antes y durante la incubación en función de la temperatura de almacenaje y su relación con el nivel de dormición

Los achenes incubados a 11°C provenientes del almacenaje a 25°C presentaron un porcentaje de germinación significativamente superior al observado para achenes almacenados a 5°C. Sin embargo, los embriones extraídos de estos achenes no presentaron diferencias en el porcentaje de germinación, alcanzando en ambos casos un nivel de 100% de germinación (Fig. 3.25A).

Cuando se analizó el contenido de ABA en los embriones extraídos de los achenes provenientes de ambas temperaturas de almacenaje, se observó un aumento del contenido de ABA luego de 24 hs de incubación ($p=0.0024$). Sin embargo, este contenido de ABA fue significativamente mayor en los achenes almacenados a 5°C que en los almacenados a 25°C ($p=0.0059$), tanto antes de comenzar la incubación (0 hs), como luego de 24 hs de incubación (Fig. 3.25B).

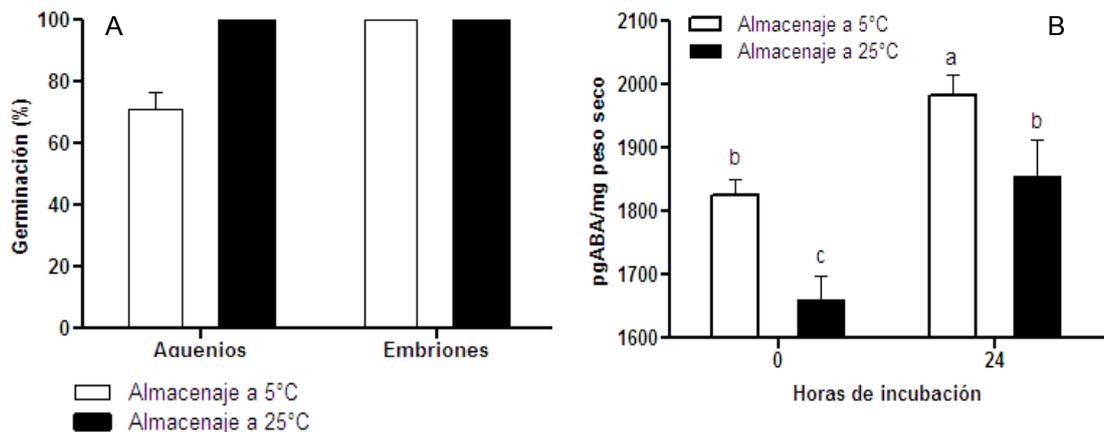


Fig. 3.25. Porcentaje final de germinación de achenios y embriones luego de 20 días de incubación a 11°C (A) y contenido de ABA (pg/mg de peso seco) en embriones extraídos de achenios almacenados a 5°C (columnas blancas) y 25°C (columnas negras) (B). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Las barras de error indican error estándar.

Cuando se analizó el contenido de ABA pero discriminado en función de los diferentes tejidos que componen el embrión (eje embrionario y cotiledones), se observó que para los ejes embrionarios no existieron diferencias significativas en el contenido de ABA entre ambas temperaturas de almacenaje ($p=0.4034$) así como tampoco entre los momentos de incubación evaluados ($p=0.0527$); sin embargo, el aumento en el contenido de ABA luego de 24 hs de incubación fue numéricamente mayor en ejes embrionarios provenientes de achenios almacenados a 5°C (Fig. 3.26A). En los cotiledones, las diferencias en relación al contenido de ABA según la temperatura de almacenaje dependieron del momento de incubación ($p=0.0191$). Previo a la incubación (0 hs) el contenido de ABA de los cotiledones provenientes del almacenaje a 5°C fue significativamente mayor que en los provenientes del almacenaje a 25°C; y si bien se observó la misma tendencia luego de 24 hs de incubación, en este caso las diferencias no fueron significativas (Fig. 3.26B). De los resultados obtenidos surge que la concentración de ABA en los cotiledones fue alrededor de dos veces la cuantificada en los ejes embrionarios (Fig. 3.26 A y B).

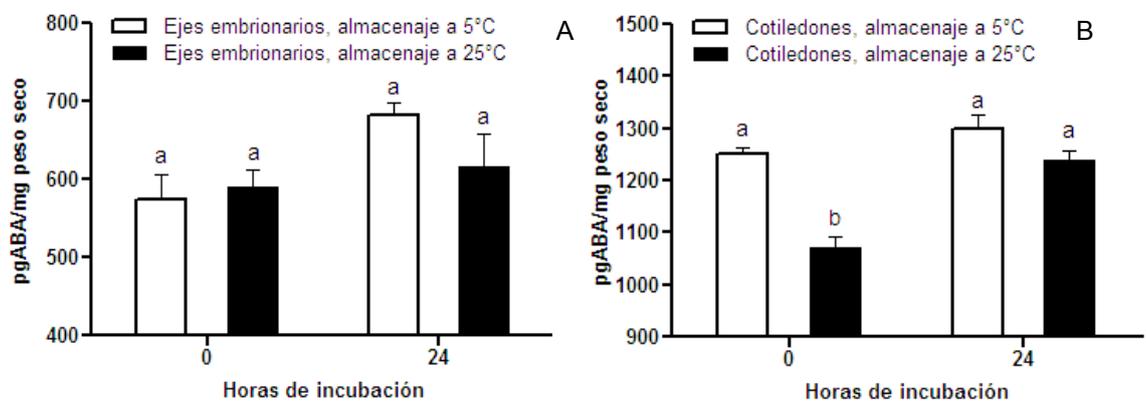


Fig. 3.26. Contenido de ABA (pg/mg de peso seco) en ejes embrionarios (A) y en cotiledones (B) extraídos de achenios almacenados 5°C (columnas blancas) y 25°C (columnas negras) a las 0 y 24 hs de incubación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Las barras de error indican error estándar.

En el segundo ensayo realizado, los aquenios incubados a 11°C provenientes del almacenaje a 25°C presentaron valores de germinación de 100%, mientras que aquellos almacenados a 5°C presentaron valores de germinación significativamente menores. Sin embargo, los embriones extraídos de estos aquenios no presentaron diferencias en el porcentaje de germinación, alcanzando en ambos casos un nivel de 100% de germinación (Fig. 3.27A).

El contenido de ABA en los embriones extraídos de los aquenios provenientes de las distintas temperaturas de almacenaje presentó variaciones que dependieron del tiempo de incubación ($p < 0.0001$). Antes de comenzar la incubación (0 hs), se observó un mayor contenido en los provenientes del almacenaje a 5°C en comparación a lo observado en los almacenados a 25°C (Fig. 3.27B). A las 15 hs de incubación, los embriones provenientes del almacenaje a 25°C mostraron un pico de ABA que luego comenzó a disminuir, mientras que en aquellos embriones provenientes del almacenaje a 5°C, el contenido de ABA continuó en aumento, manteniéndose en valores significativamente superiores a los observados en aquellos almacenados a 25°C a las 24 hs de incubación (Fig. 3.27B).

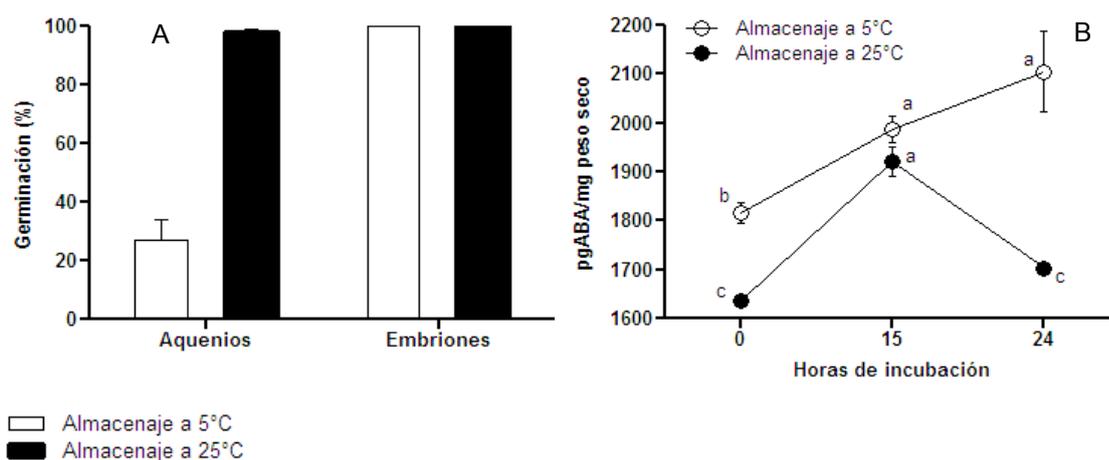


Fig. 3.27. Porcentaje final de germinación de aquenios y embriones luego de 20 días de incubación a 11°C (A) y contenido de ABA (pg/mg de peso seco) en embriones extraídos de aquenios almacenados a 5°C (símbolos blancos) y 25°C (símbolos negros) (B). Las barras de error indican error estándar.

Cuando se analizó el contenido de ABA en los ejes embrionarios y en los cotiledones por separado, se observaron diferencias en el contenido de ABA en los ejes embrionarios según la temperatura de almacenaje ($p = 0.0001$) y momento de incubación ($p = 0.0051$), siendo mayor el contenido de ABA en aquellos extraídos de aquenios almacenados a 5°C que a 25°C, en los tres momentos de incubación (Fig. 3.28A). En los cotiledones, las diferencias en relación al contenido de ABA según la temperatura de almacenaje dependieron del momento de incubación ($p < 0.0001$). A las 0 hs y 24 hs de incubación el contenido de ABA fue mayor en los cotiledones provenientes de aquenios almacenados a 5°C, no siendo así a las 15 hs de incubación (Fig. 3.28B). Al igual que en el experimento anterior los valores de concentración de ABA de los cotiledones duplicaron los determinados en los ejes embrionarios.

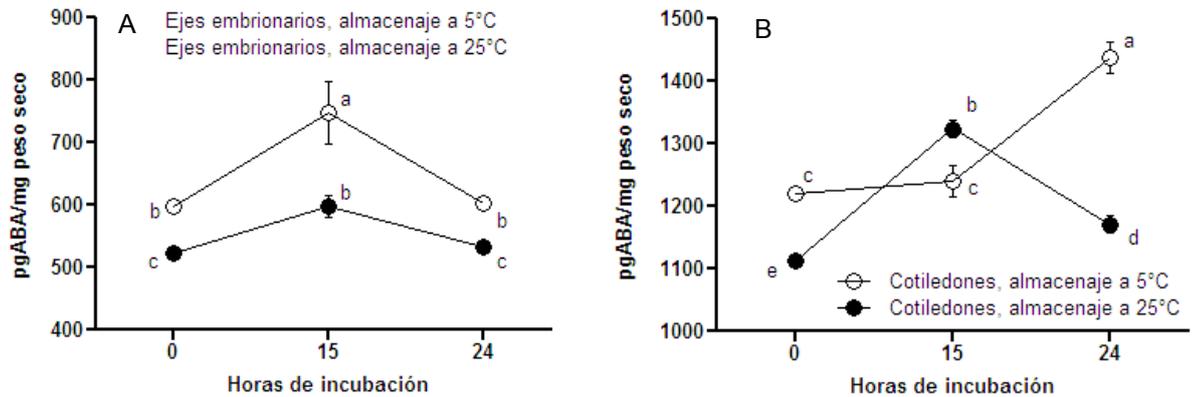


Fig. 3.28. Contenido de ABA (pg/mg de peso seco) en ejes embrionarios (A) y en cotiledones (B) extraídos de aquenios almacenados 5°C (símbolos vacíos) y 25°C (símbolos llenos) a las 0, 15 y 24 hs de incubación. Las barras verticales indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Discusión y conclusiones

Los resultados descriptos en el presente capítulo aportan evidencias de que el ambiente térmico afecta la tasa de salida de la dormición de los frutos de girasol durante la etapa de almacenaje post-cosecha. Así, ambientes de mayor temperatura durante el almacenaje (i.e. 25°C) se asociaron a incrementos en la tasa de salida de la dormición, determinando mayores porcentajes de germinación al final del período de almacenaje (menores niveles de dormición final), en relación a lo observado en ambientes de menor temperatura (i.e. 5°C), en los que se observó una menor tasa de salida de la dormición durante el almacenaje (Fig. 3.1, 3.2 y 3.3). Estas diferencias en la dinámica de salida de la dormición según la temperatura de almacenaje, tendieron a maximizarse en frutos que fueron expuestos a una mayor temperatura durante el llenado (que presentaron una salida más lenta de la dormición) (Fig. 3.2), en relación a los frutos desarrollados a una menor temperatura durante el llenado (que presentaron una salida más rápida de la dormición) (Fig. 3.1). Esta evidencia sugiere que la magnitud del efecto del ambiente térmico durante el almacenaje sobre el patrón de salida de la dormición se vería afectada por el ambiente térmico explorado por los frutos durante el llenado, lo cual podría explicar, al menos en parte, los resultados contradictorios que han sido reportados en la literatura en relación al efecto del ambiente térmico durante el almacenaje sobre la dormición en girasol.

En dos de los cinco lotes evaluados no se observaron diferencias significativas en el patrón de salida de la dormición de los aquenios entre ambas temperaturas de almacenaje (Fig. 3.4 y 3.5). En el primer caso (Fig. 3.4), la falta de respuesta probablemente esté asociada a que la dormición embrionaria a 5°C disminuyó más rápidamente que en el resto de los lotes. Por ejemplo, ya a los 45 días post-cosecha los embriones provenientes de ese lote almacenados a 5°C germinaron cerca del 70% (Fig. 3.6), mientras que en el resto de los lotes no alcanzaron ese porcentaje de germinación en todo el período de evaluación (Fig. 3.7, 3.8, 3.9). En el segundo caso (Fig. 3.5), la falta de respuesta probablemente se deba a que los niveles de dormición de los frutos a cosecha fueron significativamente menores que los observados en el resto de los lotes,

por lo que la dormición rápidamente dejó de expresarse a 25°C de incubación. Por ejemplo, a cosecha los aquenios de este lote ya alcanzaban cerca del 50% de germinación (Fig. 3.5), mientras que en el resto de los lotes los porcentajes de germinación eran menores al 10% (Fig. 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4).

Cuando se observó la respuesta de los embriones extraídos de los aquenios de los mismos lotes, en todos los casos se observó una salida diferencial de la dormición en función de la temperatura de almacenaje. En efecto, los embriones provenientes de aquenios almacenados a 25°C presentaron una salida de la dormición más rápida que aquellos provenientes del almacenaje a 5°C (Fig. 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9). Estas respuestas de los aquenios y embriones a la temperatura de almacenaje pudieron ser observadas a las temperaturas de incubación en donde la dormición se expresó en forma relativa para cada caso, es decir, a 25°C de incubación en los aquenios y a 11°C de incubación en los embriones.

Al evaluar el patrón de salida de la dormición a varias temperaturas de almacenaje dentro del rango 5°C a 30°C (Fig. 3.14), se observó que los aquenios expuestos a mayores temperaturas de almacenaje presentaron menores niveles de dormición (mayores porcentajes de germinación finales y/o velocidades de germinación, ésta última cuantificada a través del tiempo al 50% de germinación) (Fig. 3.15 y 3.16). Sin embargo, el almacenaje a 10°C no se diferenció de las mayores temperaturas de almacenaje en relación a su efecto sobre el nivel de dormición de los aquenios. En este sentido, existe la posibilidad de que existan distintos óptimos térmicos para la salida de la dormición, y quizás distintos mecanismos subyacentes, lo que además podría explicar, junto con el efecto del ambiente materno mencionado anteriormente, la falta de consistencia en la respuesta observada en los distintos reportes de la bibliografía. Una mayor exploración de lo que ocurre a 10°C de almacenaje deberá realizarse en futuros estudios. En relación a estos resultados, cabe destacar que este lote de semilla había sido almacenado por 12 meses previo a la aplicación de los ambientes térmicos diferenciales, lo que puede haber modificado en cierto grado la respuesta de los frutos en relación a la respuesta de frutos expuestos a estos ambientes inmediatamente luego de la cosecha.

Trabajos recientemente efectuados por Bazin *et al.* (2011) donde se evaluó la respuesta del nivel de dormición al ambiente térmico de almacenaje utilizando embriones aislados de las cubiertas, resultan parcialmente consistentes con los descriptos en el presente capítulo. Los resultados obtenidos por Bazin *et al.* mostraron un incremento de la tasa de salida de la dormición ante aumentos de las temperaturas de post-maduración cuando el contenido de humedad de los embriones fue de 10 y 12%. Sin embargo, con contenidos de humedad menores (i.e. 2.5, 4 y 5%) la respuesta fue contraria. Estos autores postulan que distintos mecanismos regulan los niveles de dormición según el contenido de humedad de la semilla, es decir, un mecanismo no enzimático actuaría como regulador a bajos contenidos de humedad, mientras que un mecanismo enzimático lo haría a mayores contenidos de humedad. No obstante, en ese trabajo no se evaluó lo ocurrido con contenidos de humedad entre 5 y 10%, rango que incluye al contenido de humedad al cual se almacenan los frutos de girasol durante el proceso de producción de semilla híbrida a nivel comercial. En efecto, durante el proceso de producción de semilla híbrida la cosecha se efectúa con un contenido de humedad de los frutos de cerca del 11%, y luego se seca hasta obtener valores de 5.5 a 6% de humedad (Garello, comunicación personal). Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que, con el mismo contenido de humedad utilizado en la

producción de semilla híbrida (6%) los frutos almacenados a mayor temperatura (25°C) presentan mayor tasa de salida de la dormición que aquellos almacenados a menor temperatura (5°C). Esto coincide con lo observado por Bazin *et al.* (2011) con contenidos de humedad superiores al 10 %, y estaría explicado por un proceso de naturaleza enzimática que responde positivamente a la temperatura. De hecho, podría estar involucrado el catabolismo del ABA, ya que el contenido embrionario de ABA fue menor luego de un tiempo de almacenaje a 25°C comparado con 5°C (Fig. 3.25B y 3.27B).

Otros autores abordaron el efecto de la temperatura sobre el nivel de dormición, aunque el foco de esos trabajos estuvo puesto en el efecto de temperaturas muy contrastantes pero aplicadas por períodos breves (entre uno y tres días). Por ejemplo, Cseresnyes (1979) encontró que un corto período de almacenaje (3 días) a 0°C resultó efectivo en la liberación de la dormición en relación a lo observado en frutos conservados a temperatura ambiente, mientras que Brunick (2007) no encontró diferencias luego de un corto período de almacenaje (1 día) a -20°C, 20°C y 50°C. Las diferencias en las respuestas observadas en estos reportes respecto a las descritas en esta tesis pueden estar asociadas, al menos en parte, a diferencias en el nivel de dormición previo a la aplicación de los tratamientos térmicos y/o al contenido de humedad de las semillas durante el almacenaje, tal como se propone en el estudio de Bazin *et al.* (2011), o bien, pueden asociarse a que los reportes de Cseresnyes (1979) y Brunick (2007) se basan en períodos de almacenaje cortos (3 días y 1 día respectivamente) mientras que los períodos de almacenaje estudiados en esta tesis fueron más prolongados. Es esperable además encontrar variabilidad en la respuesta a la temperatura en estos trabajos ya que fueron realizados con genotipos diferentes, los cuales posiblemente difieren en la contribución de las diferentes estructuras (embrión, cubierta seminal y pericarpio) al nivel de dormición.

La remoción del pericarpio y de la cubierta seminal verdadera, determinaron aumentos en el porcentaje de germinación de los aquenios almacenados a las dos temperaturas evaluadas (Fig. 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11). Los resultados obtenidos indicarían que ambos tipos de cubiertas presentan efectos en la imposición de la dormición en esta especie (Fig. 3.10 y 3.11). Sin embargo, el aumento observado en el porcentaje de germinación como resultado de la remoción de las cubiertas, fue mayor en los aquenios provenientes del almacenaje a 25°C que a 5°C (Fig. 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9), lo que indicaría que los mayores niveles de dormición observados en los aquenios almacenados a 5°C se explicarían, al menos en parte, por presentar un mayor nivel de dormición embrionaria. Así, cuando se calculó el porcentaje de la dormición del fruto explicada por dormición embrionaria y por dormición impuesta por las cubiertas, se observó que a la temperatura de almacenaje de 5°C, la dormición embrionaria explicaba en mayor medida el nivel de dormición de los frutos en relación a lo observado en aquellos almacenados a 25°C (Fig. 3.12 y 3.13). Estas observaciones son consistentes con aquellas reportadas por Bazin *et al.* (2011), en las que la tasa de salida de la dormición de embriones aislados de sus cubiertas mostró retrasos ante disminuciones de las temperaturas de post-maduración (cuando los contenidos de humedad de la semilla fueron de 10 a 12%). A medida que avanzó el período de almacenaje post-cosecha, la dormición embrionaria fue disminuyendo gradualmente (a menor tasa en los aquenios provenientes del almacenaje a 5°C que a 25°C), mientras que la dormición impuesta por las cubiertas comenzó a explicar en mayor medida los niveles de dormición observados en los aquenios (Fig. 3.12 y 3.13). Esta observación es consistente con reportes que

indican que la dormición embrionaria en esta especie se pierde rápidamente luego de la cosecha, pero que la dormición por cubiertas se mantiene por más tiempo y puede requerir mayores períodos de almacenaje en seco para revertirse (Benech-Arnold, 2004).

En el presente capítulo se evaluó además si las diferencias observadas en el nivel de dormición de los aquenios almacenados a diferentes ambientes térmicos se encontraban asociadas a diferencias en la sensibilidad a ABA, GAs y etileno, y en el contenido de ABA en los embriones antes y durante la incubación. En primer lugar, los resultados obtenidos muestran que previo a la incubación existe un mayor contenido endógeno de ABA en los embriones almacenados a menor temperatura (Fig. 3.25B y 3.27B). Esta observación sugiere que durante el almacenaje en seco a mayor temperatura el nivel de ABA disminuyó más rápidamente con respecto a los aquenios almacenados a menor temperatura, lo que podría explicar, al menos en parte, los mayores niveles de dormición observados en estos últimos. Estudios efectuados en *Nicotiana plumbaginifolia* también encontraron diferencias en el contenido de ABA en semillas secas durante su post-maduración asociadas al nivel de dormición de éstas. Así, semillas secas de *N. plumbaginifolia* con menores niveles de dormición, presentaron también menor contenido de ABA que aquellas con mayor nivel de dormición (Grappin *et al.*, 2000). Resultados similares fueron obtenidos en *Arabidopsis*, aunque con una menor magnitud de las diferencias entre los contenidos de ABA para semilla con distintos niveles de dormición (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Por otro lado, en la presente tesis también se observó que luego de 24 hs de incubación el contenido de ABA en los embriones extraídos de aquenios almacenados a menor temperatura fue mayor que el observado en los de aquenios almacenados a mayor temperatura (Fig. 3.25B y 3.27B), sugiriendo que el balance entre el catabolismo y la síntesis *de novo* de ABA durante la incubación resultaría en un mayor contenido de la hormona en los aquenios provenientes del almacenaje a menor temperatura. Así, este mayor contenido de ABA durante las primeras horas de la incubación podría estar determinando, al menos en parte, los mayores niveles de dormición observados en aquenios almacenados a menores temperaturas. Las mismas tendencias se observaron al medir por separado los cotiledones y los ejes embrionarios (Fig. 3.26 y 3.28). En este mismo sentido, Le Page-Degivry *et al.* (1996) observaron que la síntesis *de novo* de ABA se encontraba involucrada en el mantenimiento de la dormición al observar una mayor síntesis de esta hormona en embriones recién cosechados con altos niveles de dormición en comparación a aquellos que se habían liberado de la dormición.

El contenido de ABA en estos experimentos fue medido en embriones provenientes de aquenios almacenados a temperaturas contrastantes que mostraban diferencias significativas en su nivel de dormición (Fig. 3.25A y 3.27A); sin embargo, cuando se removieron las cubiertas los embriones de ambos tratamientos germinaron al 100%, evidenciando niveles nulos de dormición embrionaria. El hecho de que la remoción de las cubiertas haya eliminado las diferencias en dormición observada en los aquenios, que a su vez estaban asociadas a diferencias en el contenido endógeno de ABA durante las primeras horas de incubación, sugiere que las cubiertas podrían estar imponiendo la dormición a través de una modulación de los niveles de ABA en los embriones, probablemente disminuyendo la posibilidad de salida del inhibidor al medio de incubación, o bien dificultando la entrada de oxígeno necesaria para la actividad de las enzimas que participan en la degradación de ABA (i.e. ABA 8' hidroxilasas). En apoyo de esta última hipótesis, Rolletschek *et al.* (2007) reportaron que la provisión de oxígeno al embrión se encuentra limitada principalmente por la cubierta seminal

verdadera de los frutos de girasol determinando niveles de hipoxia en los tejidos del embrión. En ensayos preliminares se observó un menor contenido de ABA en embriones por efecto de la remoción de las cubiertas, pero estas diferencias no resultaron significativas (datos no presentados).

En el presente capítulo se observó que la aplicación de un inhibidor de la biosíntesis de ABA (fluridone) incrementó el porcentaje de germinación de los aquenios (incubados a 25°C) y embriones (incubados a 11°C) provenientes del almacenaje a menor temperatura, a diferencia de lo observado en los embriones del almacenaje a mayor temperatura en los que prácticamente no causó ningún efecto (Fig. 3.17 y 3.19). Los aumentos observados en el porcentaje de germinación ante la presencia de este inhibidor (Fig. 3.17 y 3.19) en conjunto con los mayores contenidos de ABA determinados durante la incubación en los frutos almacenados a 5°C (Fig. 3.25B y 3.27B), sugieren que la síntesis de ABA *de novo* estaría involucrada en la determinación de los mayores niveles de dormición de los frutos almacenados a menor temperatura. Diferencias en la síntesis de ABA *de novo* también se observaron al comparar embriones de girasol recién cosechados con altos niveles de dormición y embriones que ya se habían liberado de la misma (Le Page-Degivry *et al.*, 1996).

En este capítulo se observó también que la aplicación exógena de ABA al medio de incubación condujo a respuestas diferenciales por parte de los frutos almacenados bajo diferentes ambientes térmicos, sugiriendo una sensibilidad diferencial al ABA que podría explicar sus diferentes niveles de dormición. En efecto, el agregado de ABA (10uM) al medio de incubación disminuyó significativamente el porcentaje de germinación de los aquenios provenientes del almacenaje a menor temperatura respecto al medio control (fluridone) (Fig. 3.17), mientras que no produjo ningún efecto en aquellos almacenados a mayor temperatura. Así, los mayores niveles de dormición de los frutos almacenados a menor temperatura podrían explicarse, además de por un mayor contenido endógeno de ABA como fue descrito previamente, por presentar una mayor sensibilidad al ABA. Resultados similares fueron obtenidos por Ceccato *et al.*, (2011) trabajando con quinoa, donde la sensibilidad de las semillas al ABA exógeno disminuyó más rápidamente en aquellas almacenadas a 25°C (con menores niveles de dormición), que en aquellas que se mantuvieron almacenadas a 5°C (con mayores niveles de dormición).

Los resultados obtenidos sugieren también que la síntesis *de novo* de GAs estaría involucrada en la determinación del nivel de germinación de los frutos almacenados a mayor temperatura, con menores niveles de dormición, mientras que no parecería estar involucrada, al menos en la misma medida, en aquellos almacenados a menor temperatura. Así, la aplicación de un inhibidor de la biosíntesis de GAs (paclobutrazol) no disminuyó, o al menos no de manera significativa, el porcentaje de germinación de los aquenios, semillas y embriones provenientes del almacenaje a menor temperatura, mientras que sí disminuyó el porcentaje de germinación de aquellos provenientes del almacenaje a mayor temperatura (Fig. 3.20, 3.21 y 3.22). Dado que existen reportes que indicarían un efecto del paclobutrazol en el mantenimiento de los niveles de ABA mediante una inhibición parcial de su catabolismo por medio de la enzima ABA-8-hydroxylasa, no se descartan tampoco cambios por esta vía (Rademacher, 2000). La falta de respuesta por parte de los frutos almacenados a menor temperatura podría asociarse a que los mayores niveles de ABA endógeno observados en éstos impedirían la respuesta a las GAs, apoyando el modelo que indica que sería necesaria una

disminución de los niveles de ABA endógeno antes de que los niveles de GAs y la sensibilidad a GAs puedan aumentar, como fuera propuesto en párrafos anteriores (Finkelstein *et al.*, 2008).

La aplicación exógena de GAs presentó respuestas diferenciales según el ambiente térmico de almacenaje. Así, el agregado de GAs (10 μ M) al medio de incubación de los aquenios y semillas almacenados a menor temperatura (con mayor nivel de dormición) no produjo diferencias significativas en el porcentaje de germinación respecto al medio control (paclobutrazol) (Fig. 3.20 y 3.21); aunque esta falta de respuesta en el caso de los aquenios no resultó tan clara, debido a que el paclobutrazol incrementó el porcentaje de germinación de los mismos respecto al medio conteniendo sólo agua. Por el contrario, el agregado del mismo nivel de GAs sí se asoció a un incremento significativo del porcentaje de germinación de aquenios (Fig. 3.20) y semillas (Fig. 3.21) almacenados a mayor temperatura (con un menor nivel de dormición), indicando que éstos presentarían una mayor sensibilidad a esta hormona que los almacenados a menor temperatura. Esta respuesta es consistente con otros estudios en los que se ha observado que a medida que disminuye el nivel de dormición por efecto de diferentes tratamientos (secado, lavado de embriones en agua en agitación, largos períodos de almacenaje), la aplicación de GAs exógenas es progresivamente más efectiva en la promoción de la germinación (Le Page-Degivry *et al.* 1996). La posible falta de respuesta por parte de los aquenios y semillas del almacenaje a menor temperatura podría asociarse a que los mayores niveles de ABA endógeno observados en estos frutos (Fig. 3.25B y 3.27B) podrían estar interfiriendo con la respuesta a las GAs, como propone el modelo de balance hormonal (Finkelstein *et al.* 2008). En cuanto a lo observado en los embriones, el agregado de GAs exógeno al medio de incubación condujo a aumentos en el porcentaje de germinación de los embriones provenientes de ambos ambientes térmicos de almacenaje (Fig. 3.22). Teniendo en cuenta el modelo de balance hormonal que indica que es necesaria la disminución del nivel de ABA endógeno antes de que la sensibilidad a las GAs aumente (Finkelstein *et al.* 2008), el hecho de que los embriones almacenados a menor temperatura respondan a las GAs, mientras que los aquenios y las semillas del mismo almacenaje no lo hagan de forma significativa, podría deberse a la posible disminución de los niveles endógenos de ABA por degradación debido a la presencia de oxígeno en el embrión por remoción de las cubiertas. No obstante, la asociación entre la remoción de las cubiertas, los niveles de oxígeno en el embrión, los cambios en los niveles de ABA y la respuesta a las GAs deberá analizarse en mayor profundidad en futuros estudios.

En relación a la respuesta a etileno, tanto aquenios como embriones de ambas temperaturas de almacenaje presentaron respuesta al etefón (que libera etileno), incrementando significativamente el porcentaje de germinación respecto al medio control (NBD) a valores cercanos a 100% (Fig. 3.23 y 3.24). Estos resultados son consistentes con los reportados por Corbineau *et al.* (1990), en los que tanto el etileno como su precursor inmediato estimularon la germinación de embriones de girasol dormidos. La promoción de la germinación por el agregado de etefón con respecto a los controles en agua podría estar reflejando una reducción adicional en la señalización del ABA por el etileno, según lo que se conoce en otras especies (Finkelstein *et al.*, 2008). Por otro lado, en el presente trabajo, se observó que la aplicación de un inhibidor de la acción del etileno (NBD) no condujo a disminuciones en el porcentaje de germinación (Fig. 3.24). La ausencia de una respuesta negativa al NBD sugiere que la señalización del etileno no estaría modulando la germinación de los aquenios y embriones en

condiciones normales (o sea, cuando éstos son incubados sólo en agua). Esta falta de respuesta al NBD en los embriones que no expresaron dormición (aquellos provenientes del almacenaje a 25°C) contrasta con los resultados reportados por Corbineau *et al.* (1990), en los que la aplicación de este inhibidor de la acción del etileno condujo a disminuciones significativas del porcentaje de germinación de embriones no dormidos. Una posibilidad es que estas diferencias se deban a las mayores concentraciones de NBD utilizadas en el trabajo de Corbineau *et al.* (1990) en relación al presente trabajo. Sin embargo es posible también que la señalización de etileno no sea requerida en las condiciones experimentales de esta tesis, como se comentó más arriba.

En el esquema presentado en la figura 3.29 se resumen los principales resultados obtenidos en relación a los efectos del ambiente térmico experimentado por los frutos de girasol durante el almacenaje en la determinación de la dinámica de salida de la dormición, su relación con el tipo de dormición predominante, el contenido de ABA en los embriones antes y durante la incubación, los efectos de la síntesis *de novo* de ABA y GAs durante la incubación, y la sensibilidad de las distintas estructuras del fruto al ABA, GAs y etileno en la determinación del nivel de dormición.

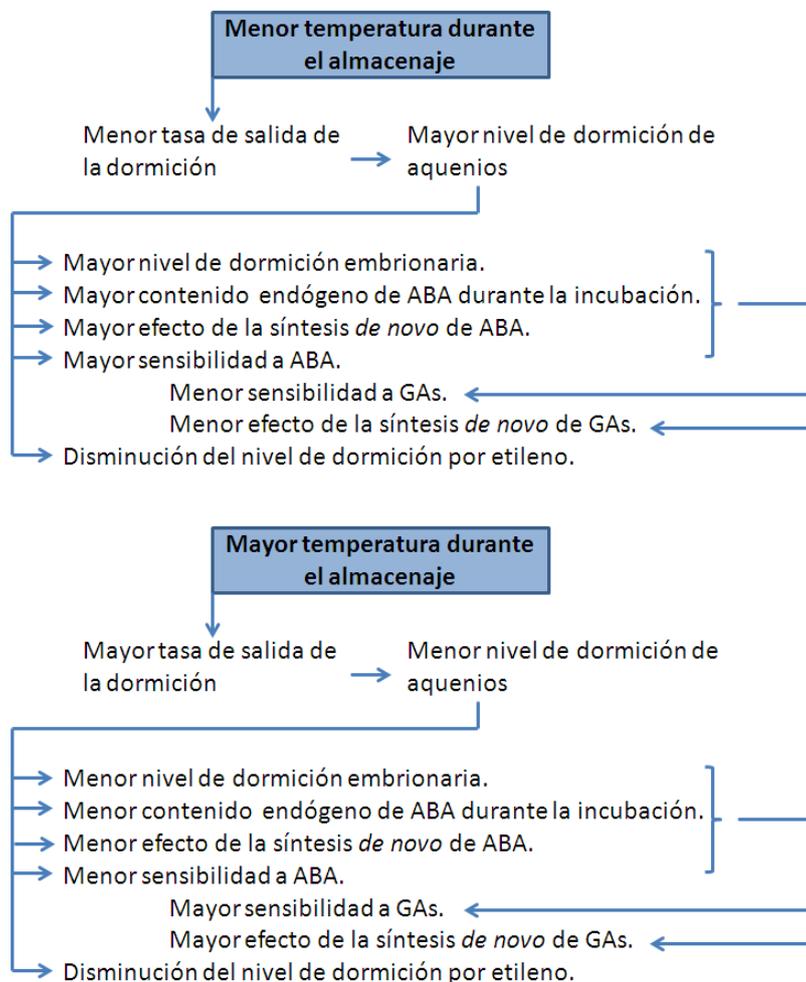


Fig. 3.29. Efecto del ambiente térmico de almacenaje sobre el nivel de dormición y su relación con el tipo de dormición predominante. Efecto de la síntesis, contenido y sensibilidad a ABA, su relación funcional con la sensibilidad a GAs, y el efecto del etileno en la determinación del nivel de dormición, en función del ambiente térmico de almacenaje.

CAPÍTULO 4
DISCUSIÓN GENERAL

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN GENERAL

Los altos niveles de dormición que los frutos de girasol suelen presentar a cosecha afectan negativamente el proceso de producción de semilla a nivel industrial y comercial. Durante este proceso, las plantas procesadoras requieren una rápida disponibilidad de semilla “despierta” y en cantidades suficientes para dar comienzo a las actividades de clasificación, curado y embolse. Sin embargo, el inicio de estas actividades se ve frecuentemente retrasado debido a los altos niveles de dormición observados en algunos lotes luego de la cosecha, representando un inconveniente para la provisión de semilla para el mercado interno y mercados de contra-estación, e incrementando los costos de producción (Zimmerman, 1977).

El nivel de dormición de un lote de semillas se encuentra determinado por el genotipo, y es modulado por las condiciones del ambiente al que éstas se exponen durante las etapas de desarrollo-maduración (llenado) y post-maduración o post-cosecha. La revisión de la literatura demuestra que existen patrones definidos en relación al efecto de los factores ambientales, con ciertos factores que tienden a presentar efectos similares sobre un amplio rango de especies. Así, mayores temperaturas, fotoperíodos cortos y condiciones de sequía durante la etapa de llenado en general se han encontrado asociados con una menor dormición a cosecha en semillas y/o frutos de numerosas especies (Fenner, 1991). Durante la etapa de post-cosecha, la humedad y el ambiente térmico regulan la tasa de salida de la dormición. Por ejemplo, la exposición a bajas temperaturas en condiciones de humedad (o estratificación) es una práctica común utilizada para disminuir el nivel de dormición en varias especies forestales y hortícolas (Allen *et al.*, 2007). Otras especies, como quinoa (Ceccato *et al.*, 2011) o arroz (Roberts, 1962) presentan el comportamiento opuesto, es decir, altas temperaturas durante la etapa de post-cosecha disminuyen el nivel de dormición.

Si bien se han reportado efectos de distintos factores del ambiente en la regulación del nivel de dormición, la temperatura ha sido señalada como uno de los factores principales (Batlla, 2004, Allen *et al.*, 2007). Considerando el rol preponderante de la temperatura en la modulación del nivel de dormición, y que la actividad de producción de semilla a nivel comercial tiene lugar en un amplio rango de ambientes térmicos, resulta esencial conocer la manera en que el ambiente térmico explorado por las semillas durante su etapa de llenado y de almacenaje luego de cosecha, regula el nivel de dormición. Este conocimiento, particularmente para aquellas especies como el girasol en las cuales el exceso de dormición es un problema, permitirá potencialmente guiar la toma de decisiones tendientes a disminuir los efectos negativos que esta situación provoca en la producción de semilla a nivel comercial.

En los capítulos anteriores (Capítulos 2 y 3) se caracterizó el rol de la temperatura en la regulación de los cambios en el nivel de dormición que experimentan los frutos de girasol durante las etapas de llenado y post-cosecha. Asimismo, se exploraron algunos aspectos ecofisiológicos en relación a los mecanismos a través de los cuales la temperatura regularía el nivel de dormición en esta especie durante las etapas mencionadas.

En la figura 4.1 se representa un modelo conceptual de la regulación del nivel de dormición en frutos de girasol por efecto del ambiente térmico generado a partir de los resultados obtenidos en esta tesis. En el mismo se describe (1) el efecto del ambiente

térmico materno sobre el nivel de dormición a cosecha, su relación con el tipo de dormición predominante y la sensibilidad a ABA, y (2) el efecto del ambiente térmico durante el almacenaje post-cosecha sobre el nivel de dormición, su relación con el tipo de dormición predominante, el contenido de ABA en los embriones y la sensibilidad a ABA y GAs.

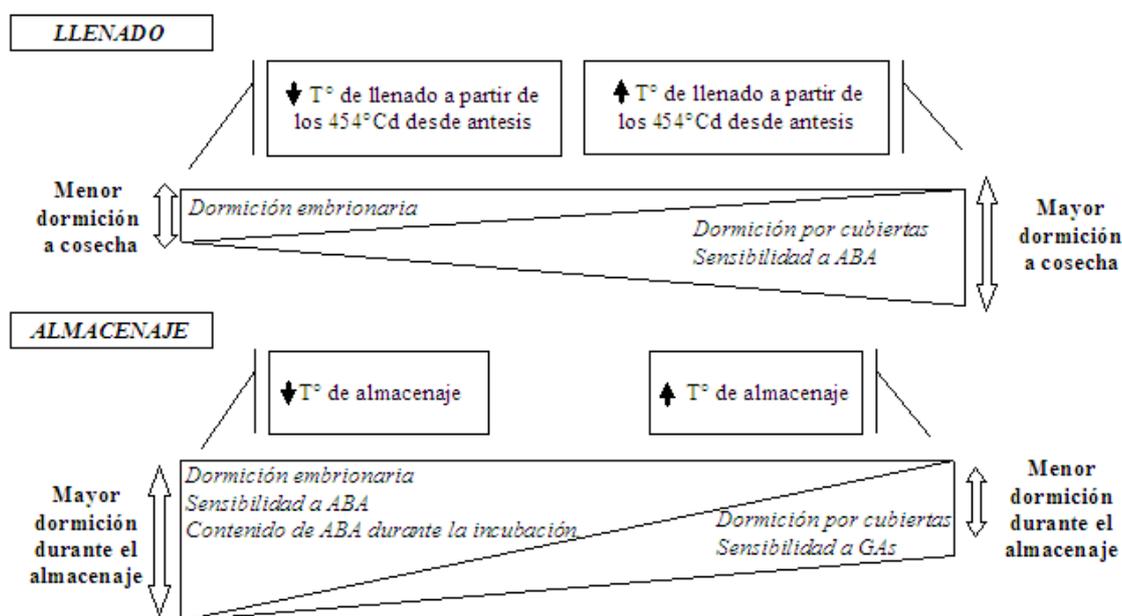


Fig. 4.1. Modelo conceptual esquemático del control de la dormición en frutos de girasol, generado a partir de los datos obtenidos en esta tesis.

Para la discusión general y conclusiones de los resultados presentados en los capítulos anteriores, esta sección se dividirá en una primera parte, en la cual se discutirán los resultados obtenidos en relación al efecto del ambiente térmico durante las etapas de llenado y almacenaje post-cosecha sobre el nivel de dormición, una segunda sección donde se discutirán los resultados obtenidos en relación a los efectos de las estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición y su relación con el ambiente térmico de llenado y almacenaje, y una tercera sección, en donde se desarrollarán los resultados relacionados a la asociación entre el ambiente térmico, la regulación hormonal y su posible relación con el nivel de dormición. Por último, se puntualizarán las posibles implicancias agronómicas de los resultados obtenidos, así como las posibles futuras líneas de investigación derivadas de los mismos.

Efectos del ambiente térmico explorado durante la etapa de llenado y almacenaje post-cosecha sobre el nivel de dormición en frutos de girasol

Se ha encontrado para diversas especies, que el nivel de dormición de las semillas y/o frutos generalmente se intensifica ante condiciones de menor temperatura durante la etapa de desarrollo-maduración en la planta madre (llenado) (Fenner, 1991; Benech-Arnold, 2004). Algunas excepciones a esta regla general fueron reportadas en quinoa (Ceccato, 2011), soja (Keigley y Mullen, 1986) y *Stylosanthes amata* (Argel y Humphreys, 1983). En estas especies, temperaturas altas durante el llenado de las

semillas y/o frutos se asociaron a aumentos en sus niveles de dormición. Algunos trabajos basados en ensayos en invernáculo bajo regímenes de temperaturas constantes (Fonseca, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003) aportan evidencias que sugerirían que también en girasol, mayores temperaturas durante el llenado estarían asociadas a mayores niveles de dormición de los frutos al momento de la cosecha. En estos trabajos, se observó que frutos expuestos a mayores temperaturas durante la mayor parte del llenado presentaron menores porcentajes de germinación que aquellos expuestos a temperaturas más bajas, mientras que períodos cortos de alta temperatura (7 días) no produjeron efectos significativos (Rodríguez *et al.*, 2003). Tampoco se observaron efectos significativos sobre el porcentaje final de germinación cuando sólo la inflorescencia fue expuesta a mayores temperaturas durante el llenado (Libenson, 1995).

Los resultados obtenidos en esta tesis, los cuales fueron generados a partir de ensayos a campo y conducidos bajo las mismas prácticas que las aplicadas en el proceso de producción de semilla híbrida a nivel comercial, avalan las respuestas observadas por Fonseca (2000) y Rodríguez *et al.* (2003). En efecto, los cambios en el nivel de dormición de los frutos de girasol a cosecha y durante la post-cosecha se encontraron estrechamente relacionados con la temperatura a la que se expusieron los frutos durante el llenado. Así, un ambiente de mayor temperatura durante esta etapa se asoció a mayores niveles de dormición a cosecha y a una menor tasa de salida de la dormición durante la post-cosecha en comparación al ambiente control de menor temperatura (Fig. 2.11, 2.12 y 2.15). Esta respuesta también fue observada en los ensayos con diferentes fechas de siembra (Fig. 2.6), en donde las siembras tempranas, expuestas a mayores temperaturas durante el llenado, se asociaron a una mayor dormición de los frutos a cosecha y a un patrón de salida de la dormición más lento que los frutos de la fecha de siembra más tardía, expuestas a menores temperaturas durante el llenado. Estos resultados nos permiten aceptar la hipótesis 1: *“el ambiente térmico explorado durante la etapa de llenado afecta el nivel de dormición de los frutos de girasol a cosecha. Mayores temperaturas experimentadas por los frutos durante la etapa de llenado determinan un mayor nivel de dormición a cosecha”* (Fig. 4.1). Estas “mayores” temperaturas durante el llenado son consideradas dentro del ambiente térmico explorado en cada uno de los experimentos, en futuras investigaciones se debería confirmar si esta respuesta se verifica dentro de otros rangos térmicos.

Sin embargo, tal como se discutiera en el Capítulo 2, en función de la comparación de los resultados obtenidos en los distintos experimentos, surge que la temperatura no sería el único factor ambiental que regularía el nivel de dormición durante el llenado en esta especie. En este sentido, la diferencia observada en el nivel de dormición a cosecha entre la fecha de siembra temprana y la fecha de siembra tardía (Fig. 2.6) fue significativamente mayor que la diferencia observada entre los tratamientos de mayor y menor temperatura aplicados en forma controlada (Fig. 2.11). Esto sugiere que las diferencias en fotoperíodo y/o radiación resultantes de las variaciones en la fecha de siembra (Cuadro 2.1) también podrían estar ejerciendo efectos en la determinación del nivel de dormición en esta especie. Resultados recientes, donde se observó un efecto significativo de ambos factores (fotoperíodo y nivel de radiación) sobre el nivel de dormición en frutos de un línea endocriada de girasol, apoyarían esta hipótesis (Pizzorno *et al.*, 2012).

Así como ocurre con otros factores del ambiente, el momento de ocurrencia de ciertos regímenes térmicos durante el ciclo de vida parental determina su resultado

(Fenner, 1991). Por ejemplo, en algunas especies de *Lolium*, la aplicación de bajas temperaturas cerca de anthesis redujo la dormición, mientras que durante el período de llenado efectivo, la incrementó (Wiesner y Grabe, 1972). En la presente tesis se evaluó si el aumento en el nivel de dormición observado en frutos de girasol como consecuencia de mayores temperaturas durante el llenado se observaba indistintamente del momento de ocurrencia de esas mayores temperaturas. Los resultados obtenidos indican que, también en esta especie, el momento de exposición de los frutos a mayores temperaturas durante el llenado condiciona la respuesta observada. Así, cuando las mayores temperaturas ocurrieron hacia fines del llenado (i.e. a partir de los 454°Cd desde anthesis, $T_b=6^\circ\text{C}$) se observó un incremento en el nivel de dormición de los frutos (Fig. 2.15 y 4.1). En contraste, cuando las mayores temperaturas ocurrieron hacia el inicio del llenado, no se observaron diferencias significativas en el nivel de dormición respecto al testigo de menores temperaturas (Fig. 2.15). Una respuesta similar fue reportada en cebada, donde altas temperaturas hacia fines de llenado (300-350°Cd desde anthesis) fueron las que presentaron mayor correlación con los niveles de dormición observados a cosecha (Rodríguez *et al.*, 2001).

Luego de la cosecha, el ambiente térmico al que se exponen las semillas también ejerce un rol en la dinámica de salida de la dormición. La temperatura es considerada un factor crítico que afecta la tasa de salida de la dormición durante el almacenaje. En muchas especies, la salida de la dormición se acelera ante aumentos en la temperatura de post-maduración o almacenaje post-cosecha (Hilhorst, 1995; Bazin *et al.*, 2011). Ejemplos de este tipo de respuesta han sido documentados para *Chenopodium album* (Karssen, 1970), *Chenopodium quinoa* (Ceccato, 2011) y arroz (Roberts, 1962), entre otros.

Tal como se mencionara en los capítulos anteriores, en girasol existe cierta controversia, tanto en la industria como en la literatura, acerca del efecto que ejerce el ambiente térmico sobre la modulación del nivel de dormición durante el almacenaje. Esta controversia probablemente se deba a la diferente combinación de genotipos, tipo de estructura utilizada en los experimentos (i.e. embrión o fruto completo), temperaturas, momentos y duración de los tratamientos aplicados en cada trabajo. Por ejemplo, los trabajos reportados por Cseresnyes (1979) y Brunick (2007), utilizaron períodos de almacenaje cortos (3 días y 1 día respectivamente) para evaluar el efecto de la temperatura de almacenaje sobre la salida de la dormición. Mientras que Cseresnyes (1979) encontró que el almacenaje a 0°C resultó efectivo en la liberación de la dormición, Brunick (2007) no encontró diferencias con almacenajes a temperaturas contrastantes (-20°C , 20°C y 50°C). En otros estudios, Bazin *et al.* (2011), utilizando embriones desnudos de girasol, puso de manifiesto la importancia de la interacción entre el contenido de humedad de las semillas y la temperatura de almacenaje en la determinación de la salida de la dormición. Los resultados indican que la tasa de salida de la dormición mostró incrementos ante aumentos de las temperaturas de almacenaje, cuando los contenidos de humedad de la semilla fueron de 10 a 12%. Con contenidos de humedad menores (i.e. 2.5, 4 y 5%), la respuesta fue contraria. Así, el punto de inflexión en el cual la respuesta comenzaría a ser diferente se encuentra entre 5 y 10% de humedad, rango que incluye al contenido de humedad al cual se almacenan los frutos de girasol durante el proceso de producción de semilla híbrida. En efecto, durante este proceso, la cosecha se efectúa con un contenido de humedad de los frutos de cerca de 11%, y luego se seca hasta obtener valores de humedad de 5.5 a 6% (Garello, comunicación personal). Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que, con

el mismo contenido de humedad utilizado en la producción de semilla híbrida (i.e. 6%) los frutos almacenados a mayor temperatura (25°C) presentan mayor tasa de salida de la dormición que aquellos almacenados a menor temperatura (5°C) (Fig. 3.1, 3.2, 3.3 y 4.1). Estos resultados nos llevan a rechazar la hipótesis 2: *“la temperatura explorada durante el almacenaje post-cosecha afecta el nivel de dormición de los frutos de girasol. Mayores temperaturas de almacenaje (>20°C) retrasan la salida de la dormición de los frutos en comparación con lo observado a menores temperaturas (<10°C)”*.

Cuando se evaluó el patrón de salida de la dormición a varias temperaturas de almacenaje dentro del rango 5°C a 30°C, la respuesta presentó la misma tendencia (Fig. 3.14). Mayores temperaturas de almacenaje se asociaron a incrementos de la tasa de germinación y/o a mayores porcentajes de germinación final (i.e. menores niveles de dormición) (Fig. 3.15 y 3.16). Sin embargo, cabe destacar que en estos experimentos el almacenaje a 10°C no se diferenció de las mayores temperaturas de almacenaje evaluadas en cuanto a la tasa de salida de la dormición y al porcentaje de germinación final. Estos resultados plantean la posibilidad de la existencia de un mecanismo diferencial de salida de la dormición a esta temperatura de almacenaje, que conduciría a similares niveles de dormición que lo observado en mayores temperaturas, por lo que una mayor exploración de lo que ocurre a 10°C de almacenaje deberá realizarse en futuros estudios.

El efecto de la temperatura de almacenaje sobre el patrón de salida de la dormición también se encontró relacionado al ambiente térmico al que los frutos se expusieron durante el llenado. En este sentido, se observó un proceso de salida de la dormición significativamente más lento a bajas temperaturas de almacenaje en frutos expuestos a mayores temperaturas durante el llenado (Fig. 3.2) que en aquellos que fueron expuestos a temperaturas menores (Fig. 3.1). Esta situación alerta acerca de la importancia de la variación interanual en el nivel de dormición que presentan las semillas a cosecha, y su relación con el efecto del ambiente de almacenaje sobre la salida de la dormición.

Efecto de las estructuras del fruto en la determinación del nivel de dormición y su relación con el ambiente térmico durante el llenado y el almacenaje

Los altos niveles de dormición observados en los aquenios a cosecha y durante los primeros días post-cosecha resultaron de la co-existencia de dormición embrionaria y dormición impuesta por las cubiertas (Fig. 2.16). La remoción del pericarpio, y particularmente de la cubierta seminal verdadera hacia los 15 días post-cosecha aumentó significativamente el porcentaje de germinación de los aquenios incubados a 11°C. Sin embargo, la remoción de estas cubiertas determinó porcentajes de germinación menores al 100%, demostrando la existencia de cierto nivel de dormición embrionaria. Resultados similares fueron reportados por Corbineau *et al.* (1990), en los que la remoción de las cubiertas condujo a un aumento parcial en el porcentaje de germinación. En el presente trabajo, a diferencia de los reportes ya existentes en la literatura, se pone de manifiesto la importancia de la cubierta seminal verdadera en la determinación del nivel de dormición a cosecha y durante la post-cosecha, que dependiendo del momento de post-maduración, presenta mayor relevancia en la imposición de la dormición que el pericarpio.

Tal como se ha detallado en la sección previa, el nivel de dormición de los frutos fue mayor en las fechas de siembra tempranas (de mayores temperaturas durante el llenado). En la presente tesis se investigó si el ambiente térmico durante el llenado de los granos modula el tipo de dormición predominante (embrionaria o impuesta por las cubiertas). Los altos niveles de dormición de los frutos expuestos a mayores temperaturas de llenado se explicaron principalmente por una alta dormición impuesta por las cubiertas, ya que su remoción aumentó significativamente el porcentaje de germinación (Fig. 2.17). Por el contrario, las siembras tardías (de menores temperaturas durante el llenado) se asociaron a menores niveles de dormición, que principalmente se debieron a dormición embrionaria, ya que la remoción de las cubiertas sólo condujo a pequeños aumentos en el porcentaje de germinación (Fig. 2.17). La respuesta observada en cuanto al tipo de dormición predominante según las distintas fechas de siembra, efectivamente podría estar explicada por diferencias en el ambiente térmico, ya que similares respuestas fueron observadas en ensayos con manejo de temperatura en forma controlada mediante el uso de carpas. En efecto, al igual que en el experimento de fechas de siembra, los frutos provenientes de tratamientos con mayor temperatura durante el llenado, presentaron mayor dormición impuesta por cubiertas que los frutos de tratamientos con menor temperatura, en los cuales predominó la dormición embrionaria, particularmente durante los primeros 30 días post-cosecha (Fig. 2.18 y 2.19). Estos resultados nos permiten aceptar la hipótesis 3: *“frutos de girasol expuestos a ambientes térmicos durante la etapa de llenado que determinan un mayor nivel de dormición a cosecha presentan una mayor proporción de la dormición explicada por las cubiertas, en comparación con lo observado en frutos expuestos a ambientes térmicos durante el llenado que determinan un menor nivel de dormición a cosecha”* (Fig. 4.1). Respuestas similares fueron descritas para quinoa (Ceccato *et al.*, 2011), en donde las siembras tempranas de mayores temperaturas durante el llenado se asociaron a mayores niveles de dormición, explicados por dormición impuesta por las cubiertas, mientras que las siembras tardías de menores temperaturas durante el llenado se asociaron a menores niveles de dormición, explicados mayormente por dormición embrionaria.

Si bien las mayores temperaturas durante el llenado se asociaron a mayores niveles de dormición, y estos mayores niveles de dormición se explicaron a su vez por una mayor dormición por cubiertas, los resultados obtenidos indican que el pericarpio y la cubierta seminal verdadera no estarían participando en la imposición de la dormición en la misma medida, y que su importancia relativa presenta una fuerte influencia del ambiente térmico explorado por los frutos durante el llenado. Así, la cubierta seminal verdadera fue el tejido que explicó en mayor proporción los mayores niveles de dormición observados en los frutos expuestos a una mayor temperatura durante el llenado (Fig. 2.19 y 2.20), ya que la remoción de la misma condujo a mayores aumentos en el porcentaje de germinación que la remoción del pericarpio. Según trabajos efectuados en girasol por Rolletschek *et al.* (2007), la difusión de oxígeno al embrión está principalmente limitada por la cubierta seminal verdadera, y no por el pericarpio. En base a estos resultados, el mecanismo por el cual la cubierta seminal verdadera podría estar regulando el nivel de dormición de los achenios sería a través de limitaciones a la entrada de oxígeno al embrión. A su vez, esta menor disponibilidad de oxígeno podría estar limitando la actividad de las enzimas que actúan en el catabolismo de ABA (i.e. ABA 8 hidroxilasas, dependientes de la disponibilidad de oxígeno), lo que podría conducir a un mayor contenido de ABA en el embrión, explicando los mayores niveles de dormición de los achenios expuestos a un ambiente de mayor temperatura

durante el llenado. Se requerirán futuras investigaciones para confirmar el efecto de la cubierta seminal verdadera sobre el contenido de ABA en el embrión, y su relación con el ambiente térmico durante el llenado y el nivel de dormición resultante.

Más allá de los efectos del ambiente térmico sobre el nivel de dormición, y del tipo de dormición predominante, la expresión de los niveles diferenciales de dormición se encontró altamente ligada a la temperatura de incubación. En este sentido, los resultados obtenidos indican que la dormición embrionaria se expresaría más a “bajas” temperaturas de incubación (11°C) (Fig. 2.19) que a “altas” temperaturas de incubación (25°C) (Fig. 2.20). Esta observación coincide con aquellas descritas por Corbineau *et al.* (1990) en girasol, donde la dormición embrionaria se expresó en mayor medida ante bajas temperaturas de incubación (15°C). En relación a los frutos, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la dormición también se expresó en mayor medida a menor temperatura de incubación. Así, los aquenios incubados a baja temperatura (11°C) (Fig. 2.7, 2.12, 2.19) se mantuvieron con elevados niveles de dormición durante largos períodos, en contraste con lo observado a mayores temperaturas de incubación (25°C) (Fig. 2.6, 2.11 y 2.20). Esto indicaría que a medida que los frutos salen de la dormición, éstos adquirirían paulatinamente la capacidad de germinar a temperaturas cada vez menores, explicando de este modo los resultados obtenidos, en donde primero germinan a 25°C (Fig. 2.6 y 2.11) y posteriormente adquieren la capacidad de germinar a 11°C (Fig. 2.7 y 2.12). Observaciones similares fueron reportadas por Corbineau *et al.* (1990), donde luego de un largo período de almacenaje, se observó una ampliación en el rango de temperaturas permisivas para la germinación como consecuencia de un aumento en la capacidad de germinación a bajas temperaturas (10°C). En este sentido, los resultados obtenidos avalan el modelo que indica que durante el almacenaje post-cosecha en seco, las semillas experimentan cambios fisiológicos que se reflejan generalmente en una disminución de su nivel de dormición. Acompañando este proceso, los requerimientos para la germinación usualmente se convierten en menos específicos (Probert, 2000), ya que el rango de condiciones ambientales que posibilitan la germinación se amplía (Baskin y Baskin, 2004; Batlla y Benech-Arnold, 2010).

En relación a los efectos del ambiente térmico durante el almacenaje sobre el tipo de dormición predominante, los resultados obtenidos muestran que los mayores niveles de dormición observados en los frutos almacenados a menor temperatura (5°C) se explican, al menos en parte, por una mayor dormición embrionaria que en aquellos almacenados a mayor temperatura (25°C) (Fig. 4.1). En efecto, si bien la remoción de las cubiertas se asoció a aumentos en el porcentaje de germinación de los frutos en ambas temperaturas de almacenaje (Fig. 3.6, 3.7, 3.8, 3.9), estos aumentos fueron menores en los frutos almacenados a menor temperatura, ya que en ellos, el componente de dormición embrionaria fue el más significativo. La dormición impuesta por cubiertas fue cobrando mayor relevancia a medida que se fue perdiendo la dormición embrionaria, particularmente en los frutos provenientes del almacenaje a mayor temperatura. Considerando los diferentes tejidos que componen las cubiertas, los resultados han sido variables indicando que tanto el pericarpio como la cubierta seminal verdadera participarían en la imposición de la dormición durante el almacenaje post-cosecha, ya que la remoción de cualquiera de las dos estructuras resultó en aumentos significativos de los porcentajes de germinación (Fig. 3.10, 3.11, 3.12 y 3.13).

Ambiente térmico, regulación hormonal, y su relación con el nivel de dormición

Dada la importancia de la mediación hormonal en los efectos de las señales del ambiente sobre el nivel de dormición, en el presente trabajo se evaluó, en forma preliminar, si los mayores niveles de dormición observados en respuesta a mayores temperaturas durante el llenado se encontraban asociados a una mayor sensibilidad al ABA de los frutos cosechados.

Trabajos efectuados en quínoa (Ceccato, 2011), *Sorghum bicolor* (Benech-Arnold *et al.*, 1995a y Benech-Arnold *et al.*, 1995b) y cebada (Benech-Arnold *et al.*, 1999), entre otros, reportan la existencia de una asociación entre la sensibilidad de los tejidos a ABA y el nivel de dormición de las semillas. La sensibilidad a ABA puede ser diferente según el genotipo, como ocurre en embriones de distintos cultivares de trigo (Walker-Simmons, 1987) y de *Sorghum bicolor* resistentes o susceptibles al brotado pre-cosecha (Steinbach *et al.*, 1995); o bien, según el estadio ontogénico, como se describe para colza (Finkelstein *et al.*, 1987), soja (Eisenberg y Mascarenhas, 1985), embriones de girasol (Le Page- Degivry, 1996) y trigo (Walker-Simmons, 1987); o también según las condiciones ambientales, como la disponibilidad de nutrientes en *Sorghum bicolor* (Benech- Arnold *et al.*, 1995a). En estos trabajos, genotipos, estadios ontogénicos y condiciones ambientales conducentes a un mayor nivel de dormición, se asociaron a una mayor sensibilidad a ABA por parte de los frutos, semillas y/o embriones de estas especies. En el presente trabajo, los resultados obtenidos sugieren que también en girasol, el ambiente explorado por los frutos durante el llenado afecta su nivel de dormición y concomitantemente, la sensibilidad de los mismos a ABA. En efecto, los frutos expuestos a una mayor temperatura durante el llenado presentaron un mayor nivel de dormición, y en paralelo, una mayor sensibilidad a esta hormona (Fig. 4.1), ya que la aplicación exógena de 50 μM de ABA condujo a una mayor disminución del porcentaje de germinación respecto al medio control que lo observado en frutos expuestos a una menor temperatura durante el llenado (Fig. 2.21).

A su vez, los resultados obtenidos sugieren que la síntesis de ABA *de novo* durante la incubación se encontraría asociada al mantenimiento de la dormición de los frutos de girasol luego de la cosecha, ya que la aplicación de un inhibidor de la síntesis de ABA (fluridone) al medio de incubación liberó a los frutos de la dormición, determinando porcentajes de germinación cercanos al 100% (Fig. 2.21). La importancia de la síntesis de ABA *de novo* durante la incubación sobre el mantenimiento de la dormición en girasol, fue descrita en trabajos previos por Le Page-Degivry y Garello (1992) utilizando ejes embrionarios. En ese trabajo, la aplicación de fluridone al medio de incubación promovió la germinación de ejes embrionarios provenientes de embriones inmaduros con altos niveles de dormición. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la síntesis *de novo* de ABA también jugaría un rol en el mantenimiento de la dormición en frutos maduros.

En esta tesis se propuso además evaluar, en forma preliminar, si las diferencias observadas en el nivel de dormición de los frutos en respuesta al ambiente térmico durante el almacenaje se encuentran asociadas a diferencias en la sensibilidad de los frutos al ABA y las GAs. En relación a lo observado en el caso del ABA, los resultados sugieren que los mayores niveles de dormición observados en los frutos almacenados a menor temperatura podrían explicarse, al menos en parte, por presentar una mayor sensibilidad a ABA, ya que una aplicación exógena de ABA de 10 μM

condujo a una caída mayor en el porcentaje de germinación en relación a lo observado para frutos almacenados a mayor temperatura (Fig. 3.17). Estos resultados nos permiten aceptar la hipótesis 4: “*el mayor nivel de dormición que presentan los frutos de girasol expuestos a temperaturas que retrasan la salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha se asocia a una mayor sensibilidad al ABA, en comparación con lo observado en frutos expuestos a temperaturas que adelantan la salida de la dormición durante el almacenaje*” (Fig. 4.1).

El contenido de ABA del embrión es otro factor que podría explicar los diferentes niveles de dormición observados como resultado del almacenaje a las dos temperaturas evaluadas. En efecto, los resultados obtenidos mostraron que el contenido de ABA en el embrión previo a la incubación, y luego de 24 hs de incubación, fue mayor en frutos provenientes del almacenaje a menor temperatura que en aquellos provenientes del almacenaje a mayor temperatura (Fig. 3.25 y 3.27). El contenido diferencial de ABA observado previo a la incubación indicaría la existencia de una reducción diferencial del nivel de ABA endógeno durante el almacenaje en seco a ambas temperaturas. Esta observación también fue reportada en semillas de *Nicotiana plumbaginifolia* (Grappin *et al.*, 2000), en donde el contenido de ABA endógeno en semillas dormidas fue significativamente mayor al de semillas que habían disminuido su nivel de dormición durante el almacenaje en seco. Por otro lado, el mayor contenido de ABA endógeno durante la incubación observado en los frutos almacenados a menor temperatura indicaría la existencia de una dinámica de síntesis y/o catabolismo de ABA diferencial entre ambas temperaturas de almacenaje, que también podría estar explicando los mayores niveles de dormición de los frutos almacenados a menor temperatura (Fig. 3.25, 3.27 y 4.1). Mayores niveles de ABA durante la incubación de semilla dormida en comparación a semilla no dormida, fueron también reportados para el ecotipo Cvi de *A. thaliana* (Ali-Rachedi *et al.*, 2004) y para *Nicotiana plumbaginifolia* (Grappin *et al.*, 2000). Cuando el contenido ABA se analizó en función de los dos tejidos que componen el embrión (ejes embrionario + cotiledones), se observó un patrón de respuesta similar al registrado en el embrión, más allá de que en ciertos casos puntuales las diferencias observadas no fueran significativas (Fig. 3.26 y 3.28). Las diferencias observadas en el contenido de ABA durante la incubación entre temperaturas de almacenaje, sumado al hecho de que la aplicación de un inhibidor de la síntesis *de novo* de ABA determinó aumentos significativos de la germinación en frutos almacenados a menor temperatura, mientras que no produjo efectos significativos en aquellos almacenados a mayor temperatura (Fig. 3.19), sugieren que un mecanismo asociado a la síntesis de ABA *de novo* podría estar explicando, al menos en parte, los niveles diferenciales de dormición observados entre temperaturas de almacenaje.

Si bien los frutos provenientes de ambos ambientes térmicos de almacenaje presentaban diferente nivel de dormición al momento de la determinación del contenido endógeno de ABA, los embriones aislados de las cubiertas no expresaron dormición al ser incubados en agua (Fig. 3.25 y 3.27). Estos resultados sugerirían que las cubiertas podrían estar involucradas en la regulación del contenido de ABA de los embriones, donde la remoción de las mismas podría promover un aumento de la tasa de catabolismo de ABA (probablemente producto de un aumento en los niveles de oxígeno y una mayor actividad de la ABA 8' hidroxilasa), o bien posibilitar la difusión de ABA al medio, determinando una disminución de los niveles de ABA en los embriones y la no expresión de dormición. Estudios adicionales en este aspecto serían necesarios para

confirmar esta hipótesis, y lograr una mayor comprensión de los mecanismos a través de los cuales las cubiertas podrían estar regulando la dormición en frutos de esta especie.

En cuanto a las GAs, los resultados obtenidos sugieren que los mayores niveles de dormición observados en los frutos almacenados a menor temperatura también se asociarían a una menor sensibilidad de los mismos a las GAs (Fig. 3.20 y 3.21), ya que una aplicación exógena de 10 μ M de GAs no afectó la germinación de esos frutos y semillas, mientras que sí aumentó la germinación de los frutos almacenados a mayor temperatura (Fig. 3.20 y 3.21). Sin embargo, estas diferencias en sensibilidad entre temperaturas de almacenaje no fueron observadas cuando se comparó la respuesta de los embriones (Fig. 3.22), evidenciando un efecto de las cubiertas en relación a la respuesta a las GAs presentada por parte de los frutos completos; probablemente mediante un efecto indirecto a través de la modulación de los niveles endógenos de ABA como fue postulado en párrafos anteriores. Por otro lado, los resultados también sugieren un efecto de la síntesis de GAs *de novo* en la germinación de frutos almacenados a mayor temperatura, ya que la aplicación de un inhibidor de la síntesis de GAs (paclobutrazol) determinó una disminución en el porcentaje de germinación (Fig. 3.20, 3.21 y 3.22). Este mecanismo parecería no tener efecto en frutos almacenados a menor temperatura, con mayor nivel de dormición. Los resultados obtenidos nos permiten aceptar la hipótesis 5: “*el mayor nivel de dormición que presentan los frutos de girasol expuestos a temperaturas que retrasan la salida de la dormición durante el almacenaje post-cosecha se asocia a una menor sensibilidad a la GAs, en comparación con lo observado en frutos expuestos a temperaturas que adelantan la salida de la dormición durante el almacenaje*” (Fig. 4.1).

Los resultados obtenidos en relación a la respuesta a ABA y GAs apoyan el modelo ampliamente aceptado que indica que el balance entre los niveles de ABA y GAs, y entre la sensibilidad a estas hormonas, ejercerían un rol central en la regulación del nivel de dormición de las semillas, y que este balance, a su vez, estaría modulado por las señales del ambiente (Finkelstein *et al.*, 2008). Asimismo, este modelo indica que la transición desde el estado de dormición hasta el estado de “liberación de la dormición” es acompañado por una disminución en la sensibilidad al ABA y un aumento en la sensibilidad a GAs (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En efecto, en la presente tesis los resultados obtenidos evidencian que la salida anticipada de la dormición asociada al almacenaje a mayor temperatura, estaría acompañada por una disminución en la sensibilidad al ABA y un aumento en la sensibilidad a las GAs, en contraste con lo observado en los frutos provenientes del almacenaje a menor temperatura, en los que sus mayores niveles de dormición se asociaron a una mayor sensibilidad al ABA y una menor sensibilidad a las GAs. En ensayos reportados por Le Page-Degivry *et al.* (1996), se obtuvieron respuestas similares luego de exponer embriones de girasol a tratamientos que promovieron la liberación de la dormición. En estos trabajos, la sensibilidad de los embriones a ABA se redujo luego de un largo período de almacenaje, en comparación a lo observado en embriones inmaduros recién cosechados que aún presentaban altos niveles de dormición. Por otro lado, la sensibilidad a GAs aumentó luego de tratamientos que promovieron la liberación de la dormición, como secado de embriones e incubación en agua en agitación.

En esta tesis también se demostró que una aplicación exógena de etefón aumentó a valores casi máximos la germinación de frutos dormidos provenientes de ambas temperaturas de almacenaje (Fig. 3.23) y de embriones dormidos provenientes del

almacenaje a baja temperatura (Fig. 3.24). La importancia del etileno en la regulación del nivel de dormición de frutos y embriones de girasol fue previamente reportada por Corbineau *et al.* (1990). En ese trabajo, la incubación en atmósferas enriquecidas con etileno, o en medios de incubación conteniendo a un precursor del etileno (ACC), estimuló significativamente la germinación de frutos y embriones con altos niveles de dormición. Los resultados obtenidos como respuesta a la aplicación de etefón, no permitieron determinar la existencia de una sensibilidad diferencial a etileno según el ambiente térmico de almacenaje, ya que se obtuvieron porcentajes de germinación máximos para los frutos y embriones provenientes de ambos ambientes térmicos. Futuros ensayos en los que se apliquen dosis menores a las utilizadas en esta tesis serán necesarios para determinar si existe una sensibilidad diferencial al etileno asociada a los distintos niveles de dormición observados ante almacenajes a distintas temperaturas.

Según lo reportado en los capítulos anteriores, los aquenios incubados a baja temperatura (11°C) presentaron valores de germinación casi nulos aún luego de un largo período de almacenaje (Fig. 2.12, 2.16, 2.18, 2.19, 3.6, 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11). Estos bajos porcentajes de germinación no pudieron ser incrementados por una aplicación de GAs al medio de incubación, así como tampoco por la aplicación de un inhibidor de la síntesis *de novo* de ABA (fluridone) (datos no presentados). Sin embargo, los niveles de germinación se incrementaron hasta valores cercanos al 100% con una aplicación exógena de etefón (Fig. 3.23) Estos resultados sugerirían la posibilidad de un requerimiento de etileno para la germinación de frutos incubados a baja temperatura, o de la existencia de algún otro mecanismo de imposición de la dormición a bajas temperaturas no abordado en esta tesis.

A modo de resumen podemos concluir que los resultados obtenidos aportan evidencias concretas de que el ambiente térmico explorado por los frutos durante el llenado y el almacenaje afecta el nivel de dormición de los mismos a cosecha y durante la post-cosecha (Fig. 4.1). En efecto, ambientes de mayor temperatura durante el llenado se asocian a un mayor nivel de dormición, principalmente cuando las mayores temperaturas ocurren hacia fines del llenado (a partir de los 454°Cd desde antesis). Este mayor nivel de dormición se explica, al menos en parte, por una mayor dormición impuesta por las cubiertas y por una mayor sensibilidad de los frutos a ABA. A su vez, se observó que el almacenaje a menores temperaturas (5°C) retrasa la salida de la dormición de los frutos durante la post-cosecha en relación al almacenaje a mayor temperatura (25°C). Este mayor nivel de dormición asociado al almacenaje a menor temperatura, se explica, al menos en parte, por una mayor dormición embrionaria, una mayor sensibilidad al ABA, un mayor contenido de ABA en los frutos durante el almacenaje en seco y durante las primeras horas de incubación, y una menor sensibilidad a las GAs.

Implicancias agronómicas de los resultados obtenidos

Los resultados obtenidos en la presente tesis fueron generados en ensayos conducidos bajo las mismas prácticas de manejo que las aplicadas durante la producción de semilla híbrida a nivel comercial, lo cual facilita la utilización de los mismos como guía para diseñar estrategias de manejo que permitan disminuir la problemática de la dormición en la producción de semilla de girasol. Por ejemplo, los resultados descriptos en torno al efecto de la temperatura durante el llenado, y al momento donde se presentaría la mayor sensibilidad al ambiente térmico para la determinación del nivel de

dormición a cosecha, sugieren que los altos niveles de dormición observados frecuentemente en los lotes de semilla a cosecha podrían ser disminuidos, al menos en parte, a través de la selección de fechas de siembra y/o sitios que presenten menor probabilidad de ocurrencia de altas temperaturas hacia fines de la etapa de llenado. En relación a la post-cosecha los resultados sugieren que la tasa de salida de la dormición durante el almacenaje podría ser favorecida almacenando los lotes cosechados a temperaturas relativamente “altas” (25°C), permitiendo así acortar los tiempos de almacenaje de la semilla entre la cosecha y el procesamiento comercial. En relación a la expresión de la dormición, los resultados sugieren que debería recomendarse a los productores la siembra en épocas en que las temperaturas del suelo no sean muy bajas, para evitar la expresión de la dormición en genotipos susceptibles bajo estas condiciones. Por otro lado, y considerando lo observado en esta tesis en relación a la importancia del pericarpio y la cubierta seminal en la regulación de la dormición en girasol, así como la respuesta a ABA, GAs y etileno, la inclusión de materiales con variabilidad en estas características en los programas de mejoramiento, puede resultar en un valioso aporte en la búsqueda de la disminución de los problemas asociados a la presencia de dormición en esta especie.

Futuras investigaciones derivadas de los resultados obtenidos

En la presente tesis se evaluó el efecto del ambiente térmico materno y de post-cosecha sobre el nivel de dormición en frutos de girasol, y su relación con los efectos de las estructuras del fruto y la sensibilidad a las principales hormonas vegetales asociadas a este proceso. Los resultados obtenidos sugieren nuevas preguntas en relación a los mecanismos que estarían regulando la dormición en girasol, como por ejemplo:

¿Cuál es el mecanismo detrás de la dormición impuesta por las cubiertas, particularmente bajo ambientes maternos de mayor temperatura, que presentan frutos con mayor nivel de dormición? ¿Qué rol cumplen el pericarpio y la cubierta seminal verdadera en la imposición de la dormición por cubiertas? ¿Las cubiertas afectan los niveles de oxígeno en el embrión afectando el metabolismo del ABA? ¿Cuál es el mecanismo que regula las variaciones en el nivel de dormición embrionaria durante el almacenaje post-cosecha, particularmente ante almacenajes a menor temperatura y mayor nivel de dormición? ¿Existe algún mecanismo diferencial de la salida de la dormición ante almacenajes a 10°C respecto a menores temperaturas? ¿Existen diferentes óptimos térmicos para la salida de la dormición durante el almacenaje para diferentes genotipos? ¿Cuál es el mecanismo a través del cual el etefón logra liberar de la dormición a los achenios incubados a bajas temperaturas? ¿Cuál es el rol de otras hormonas vegetales y su interacción en la regulación del nivel de dormición ante ambientes térmicos diferenciales? Estas cuestiones deberían ser abordadas en investigaciones futuras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirrezábal, L.A.N.; Pereyra, V. (1998). Girasol. En: L.A.N. Aguirrezábal y F.H. Andrade (Eds.) *Calidad de productos agrícolas. Bases ecofisiológicas, genéticas y de manejo agronómico*. Unidad Integrada Balcarce, 140-197.
- Ali-Rachedi, S.; Bouinot, D.; Wagner, M-H.; Bonnet, M.; Sotta, B.; Grappin, P.; Jullien, M. (2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219: 479-488.
- Allen, P.S.; Benech-Arnold, R.L.; Batlla, D.; Bradford, K.J. (2007). Modeling of seed dormancy. En Bradford, K.J. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. 72-112.
- Argel, P.J.; Humphreys, L.R. (1983). Environmental effects on seed development and hardseededness in *Stylosanthes hamata* cv. Verano. I. Temperature. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34: 261-270.
- Baskin, J.M.; Baskin C.C. (1976). High temperature requirement for after-ripening in seeds of winter annuals. *New Phytologist*, 77:619-624.
- Baskin, J.M.; Baskin C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14: 1-16.
- Batlla, D.; Kruk, B.; Benech-Arnold, R.L. (2004). Modeling changes in dormancy in weed soils seed banks: implications for the prediction of weed emergence. En: Benech-Arnold, R.L. y Sánchez, R.A. (Eds.) *Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture*. The Haworth Press, Binghamton, NY. 8: 185-217.
- Batlla, D. (2004). Regulación de los cambios cíclicos en el nivel de dormición de semillas de *Polygonum aviculare* por efecto de la disponibilidad hídrica y la temperatura del suelo. Un modelo de simulación. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Batlla, D.; Benech-Arnold, R.L. (2010). Predicting changes in dormancy level in natural seed soil banks. *Plant Molecular Biology*, 73: 3-13.
- Bauer, M.C.; Meyer, S.E.; Allen, P.S. (1998) A simulation model to predict seed dormancy loss in the field for *Bromus tectorum* L. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1235–1244.
- Bazin, J.; Batlla, D.; Dussert, S.; El-Maarouf-Bouteau, H.; Bailly, C. (2011). Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *Journal of Experimental Botany*, 62 (2): 627-640.
- Benech-Arnold, R.L.; Fenner, M.; Eduards P.J. (1991). Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. induced by water stress during grain filling. *New Phytologist*, 118: 339-347.

- Benech-Arnold, R.L.; Fenner, M.; Edwards, P.J. (1995a). Influence of potassium nutrition on germinability, abscisic acid content and sensitivity of the embryo to abscisic acid in developing seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *New Phytologist*, 130: 207-216.
- Benech-Arnold, R.L.; Kristof, G.; Steinbach, H.S.; Sánchez, R.A. (1995b). Fluctuating temperatures have different effect on embryonic sensitivity to ABA in *Sorghum* varieties with contrasting pre- harvest sprouting susceptibility. *Journal of Experimental Botany*, 46: 711-717.
- Benech-Arnold, R.L.; Giallorenzi, M.C.; Frank, J.; Rodríguez, V. (1999). Termination of hull- imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. *Seed Science Research*, 9: 39-47.
- Benech-Arnold, R.; Sánchez, R.; Forcella, F.; Kruk, B.; Ghera, C. (2000). Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research*, 67, 105-122.
- Benech-Arnold, R.L. (2004). Inception, Maintenance and Termination of Dormancy in Grain Crops: Physiology, Genetics and Environmental Control. En Benech-Arnold, R.L. y Sánchez, R.A. (Eds.) *Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture*. The Haworth Press, Binghamton, NY. 169-198.
- Benech-Arnold, R.L.; Rodríguez M.V.; Batlla, D. (2013). Aspects of the Physiology of Seed Dormancy in Relation to its Implications for Agriculture. En: Robert Meyer (Ed.) *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. Springer, New York, 1425-1435.
- Bewley J.; Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. New York: Plenum.
- Bewley J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9:1055-1066.
- Bianco, J.; Garello G.; Le Page-Degivry M. T. (1994). Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. *Seed Science Research*, 4: 57-62.
- 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.
- Bouwmeester, H.J.; Karssen, C.M. (1993). Annual changes in dormancy and germination in seeds of *Sisymbrium officinale* (L). Scop. *New Phytologist*, 124: 179-191.
- Brunick, R. (2007). Seed dormancy in domesticated and wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.): types, longevity and QTL discovery. Dissertation submitted to Oregon State University for the degree of Doctor of Philosophy.

Ceccato, D. (2011). Efecto de las condiciones ambientales durante el desarrollo, maduración y almacenamiento sobre la dormición en semillas de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd) con tolerancia potencial al brotado pre-cosecha. Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires, Área Producción Vegetal.

Ceccato, D.; Bertero, D.; Batlla D. (2011). Environmental control of dormancy in quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: two potential genetic resources for pre-harvest sprouting tolerance. *Seed Science Research* 21: 133-141.

Corbineau, F.; Rudnicki, R.M.; Come, D. (1988). Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by high temperature. Possible involvement of ethylene biosynthesis. *Physiologia plantarum*, 73: 368-373.

Corbineau, F.; Bagniol, S.; Côme, D. (1990). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed dormancy and its regulation by ethylene. *Israel Journal of Botany*, 39: 313-325.

Cseresnyes, Z. (1979). Studies on the duration of dormancy and methods of determining the germination of dormant seeds of *Helianthus annuus*. *Seed Science & Technology*, 7:179-188.

Derkx, M.; Vermeer E., Karssen, C. (1994). Effects of light and temperature on seed dormancy and gibberellin- stimulated germination in *Arabidopsis thaliana*: studies with gibberellin deficient and insensitive mutants. *Physiol. Plant*, 89: 360-368.

Eisenberg, A.J.; Mascarenhas, J.P. (1985). Abscisic acid and the regulation of synthesis of specific seed proteins and their messenger RNAs during culture of soybean embryos. *Planta*, 166: 505-514.

Fenner, M. (1991). The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Science Research*, 1: 75-84.

Finch-Savage, W. E., Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501-523.

Finkelstein, R.R.; De Lisle, A.J.; Simon, A.E.; Crouch, M.L. (1987). Role of abscisic acid and restricted water uptake during embryogeny in *Brassica*. En: Fox, J.E. y Jacobs, M. (Eds.) *Molecular Biology of Plant Growth*. Alan R. Liss, New York, 73-84.

Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* 59: 387- 415.

Fonseca, A. (2000). Efecto de la temperatura durante el llenado de grano sobre el comportamiento de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) Trabajo de intensificación para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E., y Jullien, M. (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: Post imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* 210: 279-285.

Gutterman, Y. (1973). Differences in progeny due to day-length and hormone treatment of mother plant. En Heydecker, W. (Ed.) *Seed ecology*. London, Butterworth. 59-80.

Gutterman, Y. (1974). The influence of the photoperiodic regime and red-far light treatments of *Portulaca oleracea* L. plants on the germinability of their seeds. *Oecologia*. Berlín. 17: 27-38.

Hilhorst, H.W.M. (1995). A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5: 61-73.

Karssen, C.M. (1970). The light promoted germination of the seeds of *Chenopodium album* L. III. Effect of the photoperiod during growth and development of the plants on the dormancy of the produced seeds. *Acta Botanica Neerlandica*, 19: 81-94.

Karssen, C.M. (1982). Seasonal patterns of dormancy in weed seeds. En Khan (Ed.) *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination*. Elsevier Biomedical Press: Amsterdam, 243-270.

Keigley, P.J.; Mullen, R.E. (1986). Changes in soybean seed quality from high temperature during seed fill and maturation. *Crop Science* 26: 1212-1216.

Knowles, P.F. (1978). Morphology and anatomy. En: Carter J.F (Ed.) *Sunflower science and technology*. Agron. Monogr. ASA, Madison, WI., 19: 55-87.

Le Page-Degivry, M.T.; Barthe, P.; Garello, G. (1990). Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus* embryo dormancy. *Plant Physiology*, 92: 1164-1168.

Le Page-Degivry, M.T., Garello, G. (1992). *In situ* abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology* 98: 1386-1390.

Le Page-Degivry, M.T., Bianco, J., Barthe, P., Garello, G. (1996). Changes in hormone sensitivity in relation to onset and breaking of sunflower embryo dormancy. *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Cab International. 15: 221-231.

Libenson, S. (1995). Efecto de las temperaturas del ambiente materno sobre la dormición, el tamaño de los frutos y la calidad de aceite en girasol (*Helianthus annuus* L.) Trabajo de intensificación para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Pereyra-Irujo, G.A.; Aguirrezabal L.A.N. (2007). Sunflower yield and oil quality interactions and variability: Analysis through a simple simulation model. *Agricultural and Forest Meteorology*, 143: 252-265.

Pizzorno, L.; Batlla, D.; López Pereira, M. (2012). Effect of maternal environment on sunflower fruit dormancy (*Helianthus annuus*): photoperiod and incident radiation. *18th International Sunflower Conference*, 27 de febrero a 1 de marzo de 2012. Mar del Plata, Argentina.

Probert, R.J. (1992). The role of temperature in germination ecophysiology. En: Fenner (Ed.) *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CAB International, Melksham, 285-325.

Probert, R.J. (2000). The Role of Temperature in the Regulation of Seed Dormancy and Germination. En: Fenner M. (Ed.) *Seeds. The ecology of regeneration in plant communities*. Oxon: CABI Publishing, 11: 261–292.

Rademacher, W. (2000) Growth retardants: effects on gibberellin bio-synthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 501–531.

Roberts, E.H. (1962) Dormancy in rice seed. III. The influence of temperature, moisture and gaseous environment. *Journal of Experimental Botany*, 13: 75-94.

Rodriguez, M.V.; Margineda, M.; González Martín, J.F.; Insausti, P.; Benech-Arnold R.L. (2001). Predicting Preharvest Sprouting Susceptibility in Barley: A Model Based on Temperature during Grain Filling. *Agronomy Journal*, 93:1071–1079.

Rodríguez, M.V.; Rondanini D.; Libenson S.; Sánchez R.A. (2003). Efectos contrastantes de altas temperaturas durante todo o parte del período de crecimiento de los frutos sobre la germinación en girasol. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica & XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile. 19-21 de octubre de 2003. San Luis, Argentina. Boletín de la SAB 38: 195.

Rolletschek, H.; Borisjuk, L.; Sánchez- García, A.; Gotor, C.; Romero, L.C.; Martínez-Rivas, J.M.; Mancha, M. (2007). Temperature- dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany*, 12: 3171-3181.

Seiler, G.J. (1998). Seed maturity, storage time and temperature, and media treatment effects on germination of two wild sunflowers. *Agronomy Journal*, 90: 221-226.

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

Steinbach, H.S.; Benech- Arnold, R.L.; Kristof, G.; Sánchez, 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: 701-709.

Steinbach, H.S.; Benech-Arnold, R.L.; Sánchez, R.A. (1997). Hormonal regulation of dormancy in developing *Sorghum* seeds. *Plant Physiology*, 113: 149-154.

Stoyanova, S.; Kostov, K. (1983) Effect of seed storage temperature on the post harvest dormancy period of *Dactylis glomerata* L. *Rastenier dui Nauki*, 20: 94-100.

Stoyanova, S., Kostov, K.; Angelova, A. (1984) Influence of storage temperature on the post-harvest dormancy period of *Festuca arundinacea* Schreb. *Plant Science (Sofia)*, 21: 99-108.

Trewavas, A.J. (1982). Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. *Physiologia Plantarum*, 55: 60- 72.

Walker-Simmons, M.K. (1987). ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiology*, 84: 61-66.

Wiesner, L.E.; Grabe, D.F. (1972). Effect of temperature preconditioning and cultivar on rygrass (*Lolium* sp.) seed dormancy. *Crop Science*, 12: 760-764.

Xu, N.; Coulter, K.M.; Bewley, J.D. (1990). Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfalfa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. *Planta*, 182: 382-390.

Zimmerman, D.C. (1977). Sunflower seed germination influenced by maturity and ethrel treatment. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Fargo N.D.

ANEXO

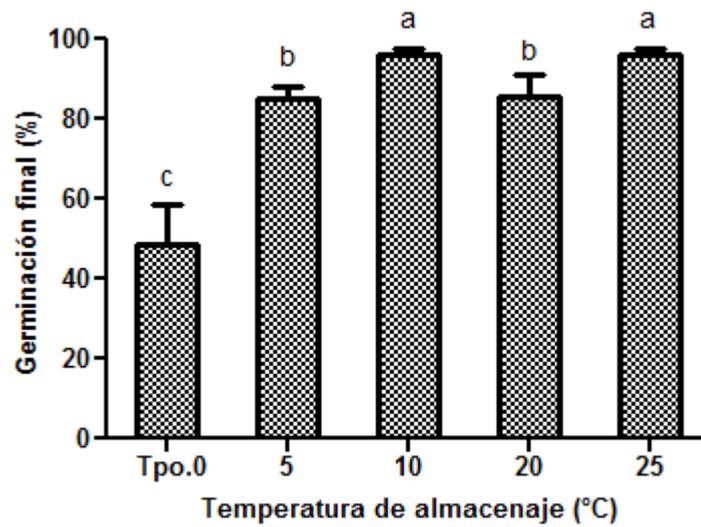


Fig. A. 3.15. Porcentaje de germinación final de achenios incubados a 15 °C previo a su almacenaje (Tpo. 0), y luego de ser almacenados durante 18 días a 5, 10, 20 ó 25°C. Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

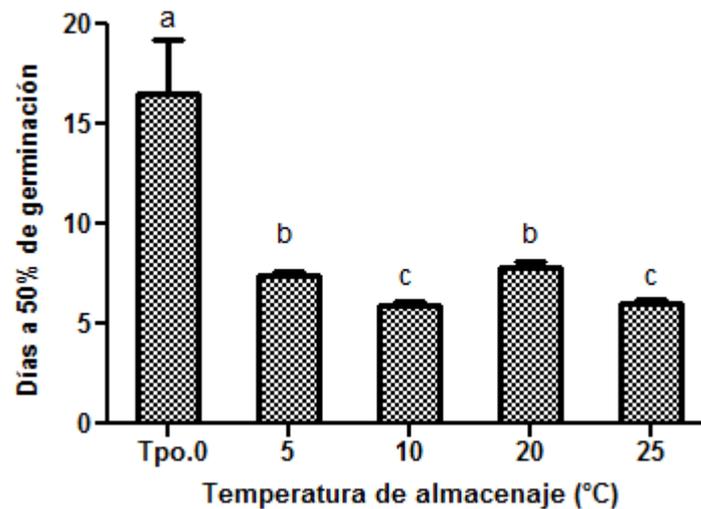


Fig. A. 3.16. Días a 50% de germinación de achenios incubados a 15°C previo a su almacenaje (Tpo. 0), y luego de ser almacenados durante 18 días a 5, 10, 20 ó 25°C. Las barras de error indican error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.