

EL EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y LA RADIACIÓN SOBRE  
EL NIVEL DE DORMICIÓN A COSECHA EN FRUTOS DE  
GIRASOL (*HELIANTHUS ANNUUS*):  
EL ROL DE LAS CUBIERTAS DEL FRUTO.

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

**Luciana Pizzorno**  
Ingeniero Agrónomo - FAUBA  
2009

Cátedra de Cultivos Industriales, Facultad de Agronomía  
Universidad de Buenos Aires



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

## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Mónica López Pereira**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

**Diego Batlla**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

## JURADO DE TESIS

Director de tesis

**Mónica López Pereira**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

**Sergio Gabriel Alemano**

Ingeniera Agrónomo (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

JURADO

**Natalia Gabriela Izquierdo**

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Mar del Plata)

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

JURADO

**Alejandro Daniel Presotto**

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Sur)

Magíster en Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Sur)

Doctor en Agronomía (Universidad Nacional del Sur)

Fecha de defensa de la tesis: 18 de noviembre de 2021

*Si para recobrar lo recobrado  
debí perder primero lo perdido,  
si para conseguir lo conseguido  
tuve que soportar lo soportado,*

*si para estar ahora enamorado  
fue menester haber estado herido,  
tengo por bien sufrido lo sufrido,  
tengo por bien llorado lo llorado.*

*Porque después de todo he comprobado  
que no se goza bien de lo gozado  
sino después de haberlo padecido.*

*Porque después de todo he comprendido  
por lo que el árbol tiene de florido  
vive de lo que tiene sepultado.*

Francisco Luis Bernández (<sup>1</sup>)

---

<sup>1</sup> Extraído del libro *Educación sin culpa* de Alejandro De Barbieri. Grijalbo (2014)

## **DEDICATORIA**

A mí *amada* familia, por confiar y no soltarme nunca la mano.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis viejos, mis hermanos y a Martín por su amor y ayuda incondicional. A mi cuñado, Germán que destino un 24 de diciembre para ayudarme a desmalezar todo el ensayo a campo. Al resto de mi Flia Pizzorno-Durante: Pichu, Lauri, Susana & Jorge y Guido por alentarme y ayudarme siempre que los necesite. Y a los nuevos retoños que se sumaron a la familia en estos 11 años que transcurrieron desde su inicio: Santi, Geromencito, Atilio, Delfina y Gerard. Sin todos ellos, todo me hubiese sido más difícil.

A mi directora, Mónica por su sinceridad, constancia y guía; las cuales fueron claves para poder finalizar esta etapa de crecimiento profesional y a mi consejero, Diego por sus aportes y por discutir mis dudas siempre que lo necesité.

A mis valiosos ayudantes de campo y laboratorio que hicieron más llevaderas las arduas jornadas de trabajo: Gerardo L., Julián B., Víctor, Carolina K., Mariana, Marina P., Yanina G., Andrea T., Noemí M., Candela K., Diego, Juan J., Ignacio B., Marianne T., Tincho T. e Hijo, Paula C. y Felipe C.

A Luis, Juan, Román, Hernán, David, Wally, Carlitos y Tornese por su ayuda, buena predisposición y rápida respuesta a los pedidos de trabajos en la parcela de Girasol.

A Anita Mantese y Silvina Enciso por su excelente trabajo y predisposición en la mediciones que se presentan en esta tesis.

A mis compañeros, Claudia, Raúl, Belén, Fernando, Juan Candao, Magui, Coni, Marianne, Honduras, Natalia, Enrique, Cristian R., Rocío, Antonio y Kelly que con sus cuentos, risas y ñoñerías alegraron mis jornadas laborales.

A todos los integrantes de la cátedra de Cultivos Industriales por permitirme desarrollarme dentro del área de la docencia, siempre con una sonrisa, buenas devoluciones y con pleno compañerismo.

A Mirta por su paciencia, eficacia, charlas y buena predisposición en resolver todos mis pedidos.

A la gente de las Cátedras de Cereales y Producción Vegetal, muchos de los cuales compartí muy buenos momentos en las clases, congresos y/o viajes.

A mis muchos y queridos amigos de FAUBA, docentes y no docentes, que coseche en los distintos momentos transcurridos en nuestra hermosa facultad.

A SMN e IFEVA por las colaborar en la recopilación de los datos meteorológicos requeridos para llevar a cabo la tesis.

A DOW Agrosience que financiaron la realización de mi trabajo y beca para poder llevar adelante la tesis con éxito.

A la Facultad de Agronomía y a la Escuela de Graduados de la FAUBA.

*in memoriam*  
Pilar Vilariño  
Ricardo Ruiz

## DECLARACIÓN

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.

*Luciana Pirzorno*

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTOS .....	V
INDICE GENERAL.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SIGNIFICADOS.....	XVII
RESUMEN.....	XIX
ABSTRACT .....	XX

### **CAPITULO 1**

INTRODUCCIÓN GENERAL, OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	20
1.1 INTRODUCCIÓN.....	21
1.2 OBJETIVOS.....	27
1.3 HIPÓTESIS .....	28
1.4 ESTRUCTURA DE TESIS.....	28

### **CAPITULO 2**

EFFECTO DEL SOMBREO DURANTE EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO DEL PERICARPIO SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN DE LOS FRUTOS DE GIRASOL	30
2.1 INTRODUCCIÓN.....	31
2.2 MATERIALES Y METODOS .....	34
2.2.1 Sitio y condiciones de crecimiento.....	34
2.2.2 Diseño experimental y tratamientos .....	35
2.2.3 Mediciones, observaciones y cálculos .....	36
2.2.3.1 <i>Condiciones ambientales</i> .....	36
2.2.3.2 <i>Fenología</i> .....	37
2.2.3.3 <i>Cosecha, acondicionamiento y almacenamiento de los frutos</i> .....	37
2.2.3.4 <i>Cubiertas seminales: Breve descripción histológica</i> .....	38
2.2.3.5 <i>Análisis Histológico de las cubiertas seminales</i> .....	39
2.2.3.6 <i>Control hormonal de la dormición: Contenido de ABA endógeno a cosecha</i>	40
2.2.3.7 <i>Control hormonal de la dormición: Sensibilidad al ABA, GAs y Etileno</i> .....	40
2.2.4 Experimentos de germinación .....	41
2.2.5 Análisis estadístico .....	42

2.3 RESULTADOS .....	42
2.3.1 Efecto del sombreado durante diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio sobre la dormición de los frutos .....	42
2.3.1.1 <i>Condiciones de crecimiento</i> .....	42
2.3.1.2 <i>Caracterización del ambiente durante la imposición de los tratamientos de sombreado</i> .....	43
2.3.1.3 <i>Dinámica del crecimiento y peso del fruto a madurez fisiológica</i> .....	46
2.3.1.4 <i>Evolución del porcentaje de germinación en función de los días después de la cosecha</i> .....	47
2.3.1.5 <i>Morfología de las cubiertas seminales</i> .....	51
2.3.1.6 <i>Control hormonal de la dormición: Contenido de ABA endógeno a cosecha</i> .....	54
2.3.1.7 <i>Control hormonal de la dormición: Sensibilidad al ABA</i> .....	55
2.3.1.8 <i>Control hormonal de la dormición: Sensibilidad a las GAs y al Etileno</i> .....	56
2.3.2 Efecto del sombreado sobre el cultivo y el canopeo sobre el nivel de dormición de los frutos .....	58
2.3.2.1 <i>Condiciones de crecimiento</i> .....	58
2.3.2.2 <i>Caracterización del ambiente durante la imposición de los tratamientos de sombreado</i> .....	59
2.3.2.3 <i>Dinámica del crecimiento y peso del fruto a madurez fisiológica</i> .....	61
2.3.2.4 <i>Evolución del porcentaje de germinación en función de los días después de la cosecha</i> .....	61
2.3.2.5 <i>Espesor de las cubiertas seminales</i> .....	62
2.4 DISCUSIÓN.....	63

### **CAPITULO 3**

<b>EFFECTO DEL FOTOPERÍODO SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN DE FRUTOS DE GIRASOL</b> .....	69
3.1 INTRODUCCIÓN.....	70
3.2 MATERIALES Y METODOS .....	71
3.2.1 Sitio y condiciones de crecimiento .....	72
3.2.2 Diseño experimental y tratamientos .....	72
3.2.3 Mediciones, observaciones y cálculos .....	73
3.2.3.1 <i>Condiciones ambientales</i> .....	73
3.2.3.2 <i>Fenología</i> .....	73
3.2.3.3 <i>Cosecha, acondicionamiento y almacenamiento de los frutos</i> .....	73
3.2.3.4 <i>Morfología de las cubiertas seminales</i> .....	74

3.2.3.5 Control hormonal de la dormición: Contenido de ABA endógeno a cosecha	74
3.2.3.6 Control hormonal de la dormición: Sensibilidad al ABA.....	74
3.2.4 Experimentos de germinación .....	75
3.2.5 Análisis estadístico .....	75
3.3 RESULTADOS .....	76
3.3.1 Caracterización del ambiente durante el ciclo de cultivo .....	76
3.3.2 Caracterización del ambiente lumínico durante el período de extensión del fotoperíodo.....	77
3.3.3 Dinámica del crecimiento y peso a madurez fisiológica del grano .....	77
3.3.4 Nivel de dormición de los frutos a cosecha y salida de la dormición.....	78
3.3.5 Morfología de las cubiertas seminales y su asociación con la dormición .....	79
3.3.6 Control hormonal de la dormición.....	82
3.3.6.1 Contenido de ABA endógeno a cosecha.....	82
3.3.6.2 Sensibilidad al ABA.....	83
3.4 DISCUSIÓN.....	84
<b>CAPITULO 4</b>	
DISCUSIÓN GENERAL.....	87
4.1 ANALISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE RADIACIÓN Y DE FOTOPERÍODO.....	88
4.2 CONTRASTE DE HIPÓTESIS .....	93
4.3. CONCLUSIONES GENERALES .....	99
BIBLIOGRAFIA .....	102

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1:</b> Datos meteorológicos promedio y duración de las fases de Siembra-Antesis (S-An) y Antesis-Madurez Fisiológica (An-MF) de los experimentos de sombreado (Exp <sub>1-2</sub> ). ...	43
<b>Tabla 2.2:</b> Temperatura media, máxima media, mínima media y media de 10-14 hs (°C) del control y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3 <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp <sub>1</sub> , A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp <sub>1-2</sub> , y PA <sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp <sub>2</sub> ] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en los Exp <sub>1-2</sub> . .....	46
<b>Tabla 2.3:</b> Peso final y sus determinantes (i.e. tasa y duración del período de llenado de fruto) del control y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3 <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp <sub>1</sub> , A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp <sub>1-2</sub> , y PA <sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp <sub>2</sub> ] ) durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en los Exp <sub>1-2</sub> .....	46
<b>Tabla 2.4:</b> Funciones ajustadas a la relación entre el porcentaje de germinación (PG) y los días después de la cosecha (ddc); y el número de días después de la cosecha necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG <sub>50</sub> , estimada con la función de ajuste entre el PG/ddc) del control y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3 <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp <sub>1</sub> , A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp <sub>1-2</sub> , y PA <sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp <sub>2</sub> ] durante ) durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio incubados a 25°C (Exp <sub>1</sub> y Exp <sub>2</sub> ) y a 12°C (Exp <sub>1</sub> ). A la derecha de las funciones ajustadas se detalla el coeficiente de regresión (R <sup>2</sup> ) y el número de observaciones usado en cada función de ajuste. Las medias ± un error estándar del PG <sub>50</sub> seguidas por letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05) entre tratamientos para cada experimento y temperatura de incubación. ....	48
<b>Tabla 2.5:</b> Datos meteorológicos promedio y duración de las fases de Siembra-Antesis (S-An) y Antesis-Madurez Fisiológica (An-MF) del experimento de sombreado (Exp <sub>3</sub> ).....	58
<b>Tabla 2.6:</b> Temperatura media, máxima media y mínima media diaria y temperatura media diaria de 10 a 14 horas (°C) del control y de los tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB <sub>CUL</sub> ) y del canopeo (SOMB <sub>CAN</sub> ) durante 12 días a partir de fin de antesis del Exp <sub>3</sub> . .....	59
<b>Tabla 2.7:</b> Temperatura media, máxima y mínima diaria y temperatura media de 10 a 14 hs (°C) de las cipselas y del canopeo de los tratamientos de sombreado del canopeo (SOMB <sub>CAN</sub> ) y del cultivo (SOMB <sub>CUL</sub> ) desde el cuarto y el octavo día de tratamiento de sombreado del Exp <sub>3</sub> . .....	60
<b>Tabla 2.8:</b> Peso final y sus determinantes (i.e. tasa y duración del período de llenado de fruto) del control (sin sombreado) y de los tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB <sub>CUL</sub> ) y del canopeo (SOMB <sub>CAN</sub> ) durante 12 días a partir fin de antesis del Exp <sub>3</sub> . .....	61
<b>Tabla 2.9:</b> Funciones ajustadas a la relación entre el porcentaje de germinación (PG) y los días después de la cosecha (ddc); y el número de días después de la cosecha necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG <sub>50</sub> , estimada con la función de ajuste	

entre el PG/ddc) del control (sin sombreado) y de los tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB <sub>CUL</sub> ) y del canopeo (SOMB <sub>CAN</sub> ) durante 12 días a partir fin de anthesis de cipselas incubadas a 25°C del Exp <sub>3</sub> . .....	62
<b>Tabla 3.1:</b> Datos meteorológicos promedio y duración de las fases de Siembra-Antesis (S-An) y Antesis-Madurez Fisiológica (An-MF) de los dos experimentos de extensión del fotoperíodo. ....	76
<b>Tabla 3.2:</b> Peso final y sus determinantes (i.e. tasa y duración del período de llenado de grano) del control (12 hs) y del tratamiento de extensión del fotoperíodo (14 hs) del Exp <sub>1</sub> y 2. Coeficiente de regresión (R <sup>2</sup> ) de la función de ajuste del peso de grano en función de los días después de anthesis del control y del tratamiento de extensión del fotoperíodo. ....	77
<b>Tabla 4.1:</b> Datos de PG <sub>50</sub> (días desde cosecha), Espesor de pericarpio (μm), datos meteorológicos (Temperatura máxima media diaria, °C y Radiación incidente media diaria, MJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> ) y Contenido endógeno de ABA de semillas de girasol a cosecha (Pg/mg) provenientes de los experimentos de sombreado realizados en diferentes estados [R <sub>3</sub> <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R <sub>3</sub> ) en el Exp <sub>1</sub> , A (desde primera anthesis a fin de anthesis) y FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de anthesis) en los Exp <sub>1-2</sub> , y PA <sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera anthesis) en el Exp <sub>2</sub> ] ) durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en los Exp <sub>1-2</sub> y de estructuras de cultivo [tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB <sub>CUL</sub> ) y del canopeo (SOMB <sub>CAN</sub> ) Exp <sub>3</sub> ] y el Exp <sub>2</sub> de fotoperíodo (12 y 14 hs). Cada columna indica el nombre de la variable y la media ± un error estándar. ....	90
<b>Tabla 4.2:</b> Valores F, niveles de significancia en el ANOVA de los parámetros y el coeficiente (R <sup>2</sup> ) de la regresión múltiple entre el número de días desde la cosecha para alcanzar un porcentaje de germinación de los frutos del 50% (PG <sub>50</sub> ) y los factores del ambiente (i.e. temperatura máxima media diaria y la radiación incidente media diaria). ...	91
<b>Tabla 4.3:</b> Valores F, niveles de significancia en el ANOVA del parámetro y el coeficiente (R <sup>2</sup> ) de la regresión simple entre el PG <sub>50</sub> y el espesor del pericarpio (μm). ....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Vista aérea de los experimentos de sombreado realizados en diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio (Exp <sub>1-2</sub> , Foto a) y en diferentes estructuras del cultivo (i.e., cultivo y canopeo) durante 12 días desde fin de anthesis (Exp <sub>3</sub> , Foto b). ....	36
<b>Figura 2.2:</b> Representación esquemática de los tratamientos realizados en los experimentos de sombreado realizados en diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio (Exp <sub>1-2</sub> ) y en diferentes estructuras de cultivo (i.e. cultivo y canopeo) durante 12 días desde fin de anthesis (Exp <sub>3</sub> ). Nivel normal (100%) de radiación incidente (controles de los Exp <sub>1-2</sub> y Exp <sub>3</sub> , Figura a) y nivel bajo de radiación incidente (20%) en todo el cultivo (Exp <sub>1-2</sub> y tratamiento SOMB <sub>CUL</sub> del Exp <sub>3</sub> , Figura b) y nivel bajo de radiación incidente (20%) en el canopeo (tratamiento SOMB <sub>CAN</sub> del Exp <sub>3</sub> , Figura c). ....	36
<b>Figura 2.3:</b> Sección longitudinal (Esquema a) y transversal (Esquema b) de fruto de girasol a madurez fisiológica. ....	39
<b>Figura 2.4:</b> Foto y esquema del fruto (cipsela, esquema a) y la semilla (cipsela sin pericarpio, esquema b) de girasol a cosecha. ....	41

**Figura 2.5:** Temperatura media (°C, Figura a) y radiación incidente diaria (MJ m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>, Figura b) de los controles durante el período de aplicación de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp<sub>2</sub>] de desarrollo y crecimiento del pericarpio en el Exp<sub>1</sub> (cuadrados vacíos) y en el Exp<sub>2</sub> (cuadrados llenos). 44

**Figura 2.6:** Temperatura media horaria del aire medida en el canopeo del control (línea continua) y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp<sub>2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub> (Figura a) y Exp<sub>2</sub> (Figura b). 45

**Figura 2.7:** Evolución del porcentaje de germinación de cipselas incubadas a 25°C en función de los días después de la cosecha del control (cuadrados llenos) y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3, triángulos vacíos invertidos) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis, triángulos vacíos) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis, cuadrados vacíos) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis, círculos vacíos) en el Exp<sub>2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub> (Figura a) y del Exp<sub>2</sub> (Figura b). El porcentaje de germinación de las cipselas se evaluó hasta que alcanzó un valor ≥85%. Las líneas verticales sobre los símbolos indican ± un error estándar de la media y se muestran solamente cuando su valor excede el tamaño de los símbolos. 48

**Figura 2.8:** Evolución del porcentaje de germinación de cipselas incubadas a 12°C en función de los días después de la cosecha provenientes del control (cuadrados llenos) y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3, triángulos vacíos invertidos); A (desde primera antesis a fin de antesis, triángulos vacíos) y en FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis, cuadrados vacíos)] durante el crecimiento y desarrollo del pericarpio del Exp<sub>1</sub>. 49

**Figura 2.9:** Porcentaje de germinación de cipselas (barras negras) y semillas (barras blancas) incubadas a 12°C (Figura a) y 25°C (Figura b) a los 27 días después de la cosecha del control y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados (R3<sub>12d</sub>, durante 12 días a partir de R3; A, desde primera antesis a fin de antesis; y FA<sub>12d</sub>, durante 12 días a partir fin de antesis) durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub>. 50

**Figura 2.10:** Porcentaje de germinación de cipselas (barras negras) y semillas (barras blancas) a los 32 días después de la cosecha incubadas a 25°C del control y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados (A, desde primera antesis a fin de antesis; FA<sub>12d</sub>, durante 12 días a partir fin de antesis y PA<sub>23d</sub>, durante 23 días a partir de primera antesis) durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en el Exp<sub>2</sub>. 51

**Figura 2.11:** Cortes transversales de pericarpios de cipselas del control (Figura a) y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3), Figura b; A (desde primera antesis a fin de antesis), Figura c y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis), Figura d] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub>. 52

<b>Figura 2.12:</b> Espesor del pericarpio (Figura a y b) y número de estratos de la capa media (Figura c y d) provenientes de cipselas del control y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3 <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp <sub>1</sub> y en A (desde primera antesis a fin de antesis), FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y en el control (sin sombreo) en el Exp <sub>1-2</sub> ] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp <sub>1</sub> (Figura a y c) y del Exp <sub>2</sub> (Figura b y d).....	53
<b>Figura 2.13:</b> Cortes transversales de membrana seminal de las cipselas del control (Figura a y c) y del tratamiento de sombreo realizado en FA <sub>12d</sub> (i.e. durante 12 días a partir fin de antesis, Figura b y d) del Exp <sub>1</sub> (Figura a y b) y del Exp <sub>2</sub> (Figura c y d).....	53
<b>Figura 2.14:</b> Largo (Figura a y b) y ancho (Figura c y d) de las células que componen la membrana seminal de cipselas provenientes del control y de los tratamientos de sombreo realizados en FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) del Exp <sub>1</sub> (Figura a y c) y de Exp <sub>2</sub> (Figura b y d).....	54
<b>Figura 2.15:</b> Contenido endógeno de ABA de semillas de girasol provenientes del control y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3 <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp <sub>1</sub> , en A (desde primera antesis a fin de antesis), FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y en el control (sin sombreo) en el Exp <sub>1-2</sub> y PA <sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp <sub>2</sub> ] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en el Exp <sub>1</sub> (Figura a) y en el Exp <sub>2</sub> (Figura b).....	55
<b>Figura 2.16:</b> Relación entre el número de días necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG <sub>50</sub> ) y el contenido endógeno de ABA de semillas de girasol provenientes del control (cuadrado) y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3 <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3, triángulo invertido) en el Exp <sub>1</sub> , A (desde primera antesis a fin de antesis, triángulo) y FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis, círculo) en los Exp <sub>1-2</sub> , y PA <sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis, círculo estrellado) en el Exp <sub>2</sub> ] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp <sub>1</sub> (símbolos llenos) y del Exp <sub>2</sub> (símbolos vacíos).....	55
<b>Figura 2.17:</b> Porcentaje de germinación de cipselas de girasol incubadas a 25°C a los 96 (Figura a) y 141 (Figura b) días desde la cosecha provenientes del control (barras negras) y de los tratamientos de sombreo [A (desde primera antesis a fin de antesis), FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y PA <sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis), barras blancas] del Exp <sub>2</sub> en diferentes medio de incubación: en Agua, Fluridone 100µM, Fluridone 100µM + ABA 10µM (Fl+ABA10) y Fluridone 100µM + ABA 100µM (Fl+ABA100)....	56
<b>Figura 2.18:</b> Porcentaje de germinación de cipselas de girasol incubadas a 25°C a los 96 días desde la cosecha provenientes del control (barras negras) y de los tratamientos de sombreo impuestos en diferentes estados [A (desde primera antesis a fin de antesis), FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y PA <sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis); barras blancas] del Exp <sub>2</sub> en diferentes medio de incubación: en agua, Paclobutrazol 100µM, Paclobutrazol 100µM + GAs 10µM (Paclo+GAs10), Paclobutrazol 100µM + GAs 100µM (Paclo+GAs100).....	57
<b>Figura 2.19:</b> Porcentaje de germinación de cipselas de girasol incubadas a 25°C a los 96 días desde la cosecha provenientes del control (barras negras) y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes ventana de tiempo [A (desde primera antesis a fin de antesis), FA <sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y PA <sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de	

primera antesis, barras blancas] del Exp <sub>2</sub> , en diferentes medio de incubación: en Agua, NBD (2, 5-norbornadiene) 100μM, NBD 100μM + Ethephon 10μM (NBD + Eth10), NBD 100μM + Ethephon 100μM (NBD + Eth100).....	58
<b>Figura 2.20:</b> Temperatura media horaria del canopeo del control (sin sombreado, línea negra continua) y de los tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB <sub>CUL</sub> ) y del canopeo (SOMB <sub>CAN</sub> ) durante 12 días después de fin de antesis (línea punteada negra) del Exp <sub>3</sub> .....	59
<b>Figura 2.21:</b> Temperatura media horaria de las cipselas del control (sin sombreado, línea negra continua) y del tratamiento de sombreado del cultivo (SOMB <sub>CUL</sub> , línea negra punteada) desde el cuarto y al octavo día de tratamiento de sombreado del Exp <sub>3</sub> .....	60
<b>Figura 2.22:</b> Evolución del porcentaje de germinación de cipselas incubadas a 25°C en función de los días después de la cosecha del control (sin sombreado, cuadrados llenos) y de los tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB <sub>CUL</sub> ) y del canopeo (SOMB <sub>CAN</sub> ) durante 12 días a partir fin de antesis del Exp <sub>3</sub> .....	62
<b>Figura 2.23:</b> Espesor del pericarpio (Figura a) y número de estratos de la capa media (Figura b) de pericarpios provenientes de cipselas del control (sin sombreado) y de los tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB <sub>CUL</sub> ) y del canopeo (SOMB <sub>CAN</sub> ) durante 12 días a partir fin de antesis del Exp <sub>3</sub> .....	63
<b>Figura 3.1:</b> Vista aérea de los experimentos de extensión del fotoperíodo durante la aplicación de los tratamientos. ....	73
<b>Figura 3.2:</b> Porcentaje de germinación de cipselas incubadas a 12°C (Figura a) y 25°C (Figura b) del control (12 hs, barras negras) y del tratamiento de extensión del fotoperíodo (14 hs, barras rayadas) durante el período de llenado del grano a los 34 y 79 días después de la cosecha del Exp <sub>1</sub> .....	79
<b>Figura 3.3:</b> Porcentaje de germinación de cipselas (barras negras) y semillas (barras blancas) del control (12 hs.) y del tratamiento de extensión del fotoperíodo (14 hs) durante el período de llenado de grano a los 23 (Figura a) y 53 (Figura b) días después de la cosecha incubados a 25°C del Exp <sub>2</sub> .....	79
<b>Figura 3.4:</b> Cortes transversales de pericarpios de cipselas de girasol cultivados bajo un fotoperíodo natural (control: 12 hs; a y c) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs; b y d) durante el período de llenado del grano del Exp <sub>1</sub> (a y b) y del Exp <sub>2</sub> (c y d). ....	81
<b>Figura 3.5:</b> Espesor del pericarpio (a y b) y número de estratos de la capa media (c y d) provenientes de cipselas del control (fotoperíodo natural: 12 hs) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs) durante el período de llenado del grano del Exp <sub>1</sub> (a y c) y del Exp <sub>2</sub> (b y d).....	81
<b>Figura 3.6:</b> Cortes transversales de membrana seminal de cipselas de girasol del control (fotoperíodo natural: 12 hs; a y c) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs; b y d) durante el período de llenado del grano del Exp <sub>1</sub> (a y b) y del Exp <sub>2</sub> (c y d).....	81
<b>Figura 3.7:</b> Largo (a y b) y el Ancho (c y d) de las células que componen la membrana seminal de cipselas provenientes del control (fotoperíodo natural; 12 hs) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs) durante el período de llenado del grano del Exp <sub>1</sub> (a y c) y del Exp <sub>2</sub> (b y d).....	82

<b>Figura 3.8:</b> Contenido endógeno de ABA de semillas de girasol a cosecha provenientes del control (fotoperíodo natural; 12 hs) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs) durante el período de llenado del grano del .....	83
<b>Figura 3.9:</b> Porcentaje de germinación de cipselas de girasol a cosecha provenientes de un fotoperíodo natural (control: 12 hs; barras negras) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs; barras blancas) del Exp1 (a) y Exp2 (b) incubados a 25°C en diferentes medio de incubación: en Agua, Fluridone 100µM, Fluridone 100µM + ABA 10µM (FI+ABA10), Fluridone 100µM + ABA 50µM (FI+ABA50), Fluridone 100µM + ABA 100µM (FI+ABA100). .....	83
<b>Figura 4.1:</b> Relación entre los días después de la cosecha para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG <sub>50</sub> ) y el espesor del pericarpio de los frutos a cosecha de los Experimentos de sombreado (cuadrados y triángulos invertidos, Exp <sub>1-2</sub> respectivamente) realizados en diferentes momentos del crecimiento y desarrollo del pericarpio y diferentes estructuras de cultivo (círculos rojos vacíos) y, de fotoperíodo (círculos grises). .....	92
<b>Figura 4.2:</b> Relación entre el número de días necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG <sub>50</sub> ) y el contenido endógeno de ABA de semillas de girasol provenientes de los Experimentos de sombreado (cuadrados y triángulos invertidos, Exp <sub>1-2</sub> respectivamente) realizados en diferentes momentos del crecimiento y desarrollo del pericarpio y, de fotoperíodo (círculos). .....	92

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SIGNIFICADOS**

**12 hs:** control (sin extensión del fotoperíodo).

**14 hs:** tratamiento de extensión del fotoperíodo.

**A:** tratamientos de sombreado desde primera antesis a fin de antesis.

**ABA:** Acido Abscísico.

**An:** Antesis.

**CIC:** capa interna comprimida.

**CM:** capa media.

**CN:** capa negra.

**ct:** citoplasma.

**ddc:** días después de la cosecha.

**dda:** días desde antesis

**EMA:** Estación Meteorológica Automática

**emb:** embrión.

**end:** endorperma.

**ep:** epidermis

**Exp1-2:** campañas 2010-11 y 2011-12 de los Experimentos de fotoperíodo sobre la dormición en frutos de girasol.

**Exp1,2:** campañas 2010-11 y 2011-12 de los Experimentos de sombreado durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio.

**Exp3:** campaña 2012-13 de los Experimentos de sombreado sobre diferentes estructuras del cultivo (i.e. canopeo y/o fruto).

**FA<sub>12d</sub>:** tratamientos de sombreado durante 12 días a partir fin de antesis.

**Fl+ABA:** Fluridone + Acido Abscísico.

**Fp<sub>E-Fl</sub>:** fotoperíodo promedio para la fase emergencia-floración

**FS:** fecha de siembra

**GAs:** Giberelinas.

**h+f:** hipodermis y una capa de fitomelanina.

**hv:** haces vasculares.

**MF:** madurez fisiológica.

**ms:** membrana seminal.

**NBD + Eth:** 2, 5-norbornadiene + Ethephon.

**NBD:** 2, 5-norbornadiene.

**PA<sub>23d</sub>:** tratamientos de sombreo durante 23 días a partir de primera antesis.

**Paclo+GAs:** Paclobutrazol + Giberelinas.

**pc:** pared celular.

**PG:** Porcentaje de germinación.

**PG<sub>50</sub>:** número de días después de la cosecha necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50%.

**r:** radios.

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de regresión.

**R3<sub>12d</sub>:** tratamientos de sombreo durante 12 días a partir de R3.

**RI:** radiación incidente diaria.

**S:** Siembra.

**SMN:** Servicio Meteorológico Nacional

**SOMB<sub>CAN</sub>:** tratamientos de sombreo del canopeo.

**SOMB<sub>CUL</sub>:** tratamientos de sombreo del cultivo.

**T<sub>b</sub>:** temperatura base

**T<sub>máx.</sub>:** temperatura máxima media.

**T<sub>mín.</sub>:** temperatura mínima media.

**TT:** tiempo térmico

## RESUMEN

La falta de información de los efectos de la radiación y el fotoperíodo sobre la dormición limitan cualquier avance que se pretenda realizar para disminuir la fuerte variabilidad interanual que presenta este carácter en el cultivo de girasol. En este contexto, el objetivo general de esta tesis fue evaluar y cuantificar el efecto de la radiación incidente (i.e. sombreado) y del fotoperíodo durante la etapa de crecimiento y maduración de los frutos sobre el nivel de dormición en una línea endocriada de girasol. Para cumplir con este objetivo se realizaron experimentos a campo donde: i) se redujo el nivel de radiación incidente sobre el cultivo (i.e. sombreado) en diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio, ii) se sembró un cultivo en una fecha de siembra tardía para obtener una diferencia entre el fotoperíodo natural y el extendido de dos horas durante el período de llenado de grano y iii) se sombreado el canopeo y todo el cultivo para identificar si el efecto de la radiación sobre la dormición es ocasionado por una limitación en la fuente y/o en la actividad de los frutos. Una reducción en la cantidad de radiación incidente sobre el cultivo en los diferentes estadios de desarrollo y crecimiento del pericarpio aumentó la velocidad de salida de la dormición luego de la cosecha. En contraposición, el fotoperíodo no afectó la dormición. El aumento de la tasa de salida de la dormición debido al sombreado se asoció a cambios en la dormición impuesta por las cubiertas del fruto y, en mucha menor medida a cambios en la dormición embrionaria. Los cambios en el espesor de las cubiertas seminales no explicaron la variación en la salida de la dormición. Por lo contrario, el número de días necesarios para alcanzar el 50% de germinación, se asoció en forma significativa y negativa con el contenido de ABA de los embriones en respuesta a los diferentes tratamientos de sombreado. En contraposición no se detectó una asociación entre la sensibilidad al ABA y el nivel de dormición. Los resultados presentados en esta tesis son un aporte original al conocimiento actual del efecto de la radiación y el fotoperíodo a la dormición, conocimientos que serán útiles para desarrollar nuevas estrategias de manejo que permitan disminuir el nivel de dormición de frutos de girasol.

Palabras clave: girasol, *Helianthus annuus*, dormición, pericarpio, fotoperíodo, radiación incidente, espesor de las cubiertas, ácido abscísico, giberelinas.

## ABSTRACT

The lack of information about the effects of radiation and photoperiod on dormancy limits any progress in reducing the strong interannual variability of this trait in sunflower. In this context, the general objective of this thesis was to evaluate and quantify the effect of incident radiation (i.e. shading) and photoperiod on the level of dormancy during fruit growth and ripening stage in an sunflower inbred line. To accomplish this objective field experiments were made, where: i) the level of incident radiation on the crop was reduced at different stages of development and pericarp growth, ii) a crop was sown at a late sowing date to obtain a difference of two hours between the natural and extended photoperiod during the grain filling period and iii) the whole crop and crop canopy were shaded to identify if the effect of radiation on dormancy is caused by a limitation by source and/or by fruits activity. A reduction in the amount of incident radiation on the crop at different stages of pericarp development and growth increased the dormancy exit rate after harvest. By contrast, photoperiod did not affect dormancy. The increase in dormancy exit rate due to the crop shading was associated with changes in dormancy imposed by the fruit coat and, to a much lesser extent, with changes in embryonic dormancy. Changes in seed coat thickness did not explain the variation in dormancy exit. On the contrary, the number of days required to reach 50% germination was significantly and negatively associated with the embryo ABA content in response to the different shading treatments. Nevertheless, there was no association between ABA sensitivity and dormancy level. These results represent a novel contribution to the current knowledge of the effect of radiation and photoperiod on dormancy. This knowledge will be useful to develop new management strategies to reduce the dormancy level in sunflower fruits.

Key words: sunflower, *Helianthus annuus*, dormancy, pericarp, photoperiod, incident radiation, seed coat thickness, abscisic acid, gibberellins.

**CAPÍTULO 1:**  
**INTRODUCCIÓN GENERAL, OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La dormición es una característica interna de las semillas que impide su germinación pese a que las condiciones exploradas son las adecuadas para que este proceso ocurra (Hilhorst, 1995; Bewley, 1997; Baskin y Baskin, 1998). El nivel de dormición en el girasol, en forma similar a lo que sucede con otras especies (Fenner, 1991), está regulado por el genotipo (Gandhi *et al.*, 2005) y por las condiciones ambientales en proporciones variables dependiendo del genotipo considerado (Lachabrouilli *et al.*, 2021). El nivel de dormición a cosecha puede variar dentro de una escala continua, que va desde un valor prácticamente nulo, el cual bajo ciertas condiciones suele provocar viviparismo (i.e. la germinación tiene lugar antes que las semillas se desprendan de la planta madre), hasta niveles máximos de dormición que impiden la rápida utilización de las semillas como simiente (Batlla y Benech Arnold, 2004; Benech Arnold, 2004). Este hecho causa inconvenientes en la multiplicación de las líneas parentales para la obtención de híbridos de girasol alto potencial de rendimiento. Las líneas que presentan altos niveles de dormición en términos generales se excluyen de los programas de mejoramiento genético debido a que ocasionan problemas de coordinación en la cadena de producción y un aumento de los costos de producción y/o almacenamiento de la semilla. El ritmo de salida de la dormición durante la post-cosecha, no sólo depende de las condiciones exploradas por las semillas durante la etapa de desarrollo-maduración, sino que también de las condiciones durante la etapa de post-maduración (Bianco *et al.*, 1994; Bewley y Black, 1994).

La dormición *per se* es un estado transitorio en la vida de una semilla (Le Page-Degivry *et al.*, 1996) que en función del momento en el que ésta se origina se distinguen dos tipos de dormición, la primaria y la secundaria (Benech-Arnold *et al.*, 2000; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La dormición primaria se adquiere durante el desarrollo y maduración de la semilla en la planta madre. Mientras que la dormición secundaria se induce en semillas maduras, que han perdido o han alcanzado un nivel mínimo de dormición primaria (i.e. de ahí el nombre “dormición secundaria”). Así por ejemplo, las semillas de malezas que perduran en los bancos de semillas del suelo suelen manifestar patrones anuales cíclicos en sus estados de dormición como estrategia de supervivencia (Batlla y Benech Arnold, 2004).

Los efectos del ambiente durante el desarrollo y crecimiento de las semillas en la planta madre afectan el nivel de dormición primaria que presentan las mismas a cosecha (Fenner, 1991). Así por ejemplo, en trigo, semillas producidas en años secos y calurosos presentan una menor dormición en comparación con aquellas producidas en años húmedos y fríos (Belderok, 1961 citado por Schuurink *et al.*, 1992). Por su parte en cebada fotoperíodos largos, altas temperaturas y baja humedad durante el desarrollo y el crecimiento de los granos disminuye el nivel de dormición a cosecha (Strand, 1989; citado por Schuurink *et al.*, 1992). En girasol, los dos únicos factores ambientales de los que se ha demostrado su efecto sobre la dormición son la temperatura durante el periodo de llenado de grano (Fonseca y Sánchez, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003 y Bodrone *et al.*, 2017) y las precipitaciones durante el ciclo de cultivo (Lachabrouilli *et al.*, 2021).

Las temperaturas altas durante el desarrollo y crecimiento de las cipselas aumentan el nivel de dormición de los frutos de girasol (Fonseca y Sánchez, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003; y Bodrone *et al.*, 2017). En este sentido, Rodríguez *et al.* (2003) obtuvieron mayores niveles de dormición a cosecha cuando expusieron plantas de girasol a altas temperaturas durante todo el período de llenado del grano (35°C vs 25°C, temperatura constante en invernáculo). Bodrone *et al.* (2017) por su parte, evaluaron el efecto de la temperatura (37°C vs 32°C, temperatura media diaria) durante el período de llenado del grano sobre la dormición en cultivos de girasol. En esta situación, el nivel de dormición de los frutos a cosecha fue similar en ambos tratamientos (i.e.  $\approx 95\%$  de semillas dormidas). Sin embargo, luego de transcurrido el primer mes después de la cosecha, los frutos provenientes de plantas expuestas a mayor temperatura presentaron un mayor nivel de dormición ( $\approx 80\%$ ) que los granos provenientes de cultivos expuestos a menor temperatura ( $\approx 40\%$ ).

La temperatura y las precipitaciones no serían los únicos factores ambientales que regularía el nivel de dormición durante el llenado del grano en girasol. Bodrone *et al.* (2017) demostraron que la dormición disminuye a medida que la fecha de siembra de los cultivos de girasol se retrasa. Los frutos provenientes de los cultivos de siembras más tempranas exhibieron un 95% de dormición a cosecha, mientras que los frutos de las fechas de siembra más tardías presentaron un 50% de dormición. La cantidad de días desde la cosecha (ddc) que transcurrieron hasta alcanzar un nivel óptimo de germinación (i.e.  $\approx 90\%$ )

disminuyeron a medida que se retrasó la fecha de siembra (i.e. 75, 60 y 30 ddc para la fecha de siembra normal, media y tardía respectivamente); lo cual sugiere que existen otros factores distintos a la temperatura, como son el fotoperíodo y la radiación, que podrían estar involucrados en la regulación del nivel de dormición de los frutos a la cosecha. En este sentido, recientemente, Lachabrouilli *et al.*, (2021) demostraron que la duración del ciclo y las precipitaciones desde siembra a cosecha regulan una parte importante de la expresión de la dormición en líneas e híbridos de girasol en Europa.

La mayoría de los trabajos citados en la literatura consultada sostienen que cambios en la duración del fotoperíodo durante el desarrollo de la semilla afectan el nivel de dormición. Así, por ejemplo en *Lactuca sativa* (L.), *Portulaca oleracea* (L.) *Amaranthus retroflexus* s, y *Chenopodium polyspermum*, los fotoperíodos cortos disminuyeron el nivel de dormición a cosecha (Fenner, 1991). En contraposición, las semillas de *Avena fatua* y *Polygonum monspeliensis* presentan un menor de nivel de dormición cuando son cultivadas bajo fotoperíodos largos (Gutterman, 1982 citado por Fenner 1991). Otro factor que varía fuertemente con los cambios en la fecha de siembra y que podría afectar los niveles de dormición es la radiación. A diferencia de lo que sucede con los otros factores (i.e. temperatura, calidad de la luz y fotoperíodo), el efecto de la radiación sobre la dormición depende la intensidad del sombreado y de la especie considerada. Así, por ejemplo, *Datura ferox* L (Sánchez *et al.*, 1981) y *Avena fatua* L (Gallagher *et al.*, 2013) redujeron el nivel de dormición de las semillas en proporciones similares a la intensidad del sombreado aplicado en cada especie (i.e. 50 y 70%, respectivamente). Mientras que Bello *et al.* (1995) demostraron que en *Abutilon theophrasti* el nivel de dormición de las semillas fue independiente a la intensidad del sombreado aplicado sobre la planta madre.

El fruto de girasol, cipsela, es un fruto seco indehisciente constituido por un aquenio procedente de un ovario bicarpelar ínfero con pericarpio duro separado de la semilla (Marzinek *et al.*, 2008). El pericarpio, a su vez, está formado por una epidermis, una hipodermis, una capa media y por una capa interna. La semilla, por su parte, está constituida por el embrión (i.e. eje embrionario y dos cotiledones) que está recubierto y protegido por la membrana seminal más restos de endosperma. La dormición primaria en

los frutos de girasol puede tener su origen en el embrión (Corbineau, 1987; Corbineau *et al.*, 1990) y/o estar impuesta por las cubiertas (Corbineau, 1987; Corbineau y Côme, 1987; Corbineau *et al.*, 1990). La dormición embrionaria se induce en una estrecha ventana de tiempo durante el desarrollo del embrión en la planta madre (i.e. desde el décimo hasta el vigésimo día después de la polinización) (Corbineau, *et al.*, 1990; Le Page-Degivry y Garello, 1992). Inicialmente los embriones inmaduros poseen la capacidad de germinar, pero a medida que avanza su desarrollo esta capacidad se pierde progresivamente hasta bloquearse completamente la germinación (Le Page-Degivry *et al.*, 1990). Una vez que el fruto llega a madurez fisiológica, la pérdida de humedad le permite recuperar en forma gradual su capacidad germinativa (Le Page-Degivry *et al.*, 1996). Paralelamente a la imposición de la dormición embrionaria comienza la dormición impuesta por las cubiertas seminales (i.e. membrana seminal y pericarpio); entre los 7 a 13 días desde la polinización, los embriones inmaduros solo germinan cuando se eliminan las cubiertas seminales (Corbineau, *et al.*, 1990 y Le Page-Degivry *et al.*, 1990). Es muy probable que la dormición impuesta por las cubiertas se mantenga durante el desarrollo y crecimiento de la cipsela, aunque su corroboración se complica debido al avance de la dormición embrionaria (Benech-Arnold, 2004). En post-cosecha los frutos de girasol almacenados en seco pierden rápidamente la dormición embrionaria mientras que la dormición impuesta por las cubiertas puede requerir varios meses para eliminarse (Benech-Arnold, 2004). Bodrone *et al.* (2017) demostraron que los frutos provenientes de diferentes fechas de siembra comentadas en el párrafo anterior presentan ambos tipos de dormición. En base a la evidencia citada precedentemente es probable que el fotoperíodo y/o el nivel de radiación explorado por los frutos de girasol durante el período de crecimiento y maduración afecten el nivel de dormición de los mismos a través de modificaciones en la dormición impuesta por embrión y/o las cubiertas del grano.

La imposición y salida de la dormición embrionaria son eventos fisiológicos que pueden explicarse a través de la interacción simultánea de diferentes hormonas vegetales (e.g. ácido abscísico, las giberelinas, etileno, el ácido jasmónico, ácido indol-3-acético y brasinoesteroides) que desempeñan un papel importante en la promoción o inhibición de estos procesos (Roselló *et al.*, 2016). El ácido Abscísico (ABA) está asociado con

imposición de la dormición (Finkelstein *et al.*, 2002) mientras que las giberelinas (GAs) (Karssen *et al.*, 1989) y el etileno (Kepczynski y Kepczynska, 1997) son las hormonas que favorecen la germinación. La regulación hormonal de la dormición está definida por: i) los contenidos endógenos de estas hormonas, que se sintetizan durante el desarrollo de las semillas, ii) la síntesis *de novo* o el catabolismo de estas hormonas durante la incubación de las semillas y iii) cambios en la sensibilidad de los tejidos seminales a estas hormonas. El contenido endógeno de ABA y la sensibilidad de los tejidos a esta hormona, juega un rol importante en la inducción y en el mantenimiento de la dormición embrionaria (Karssen y Laçka, 1986; Bewley, 1997). El ABA endógeno aumenta en forma pronunciada durante la embriogénesis, aunque luego cae bruscamente cuando los frutos de girasol maduran, siendo el balance entre síntesis y catabolismo el responsable del contenido endógeno de ABA, y por ello, del grado de dormición de los frutos a cosecha (Le Page-Degivry *et al.*, 1996). Por otra parte, la sensibilidad al ABA disminuye gradualmente, en los frutos de girasol, a medida que transcurren los días desde la cosecha. En los cereales (e.g. cebada, sorgo, entre otras) esta pérdida de sensibilidad al ABA se relacionó con la salida de dormición de las semillas de estas especies (Hilhorst, 1995; Benech-Arnold y Sanchez, 1995; Steinbach *et al.*, 1995; y Benech-Arnold *et al.*, 2000). La sensibilidad *per se* puede ser modificada genéticamente o por las condiciones exploradas por la planta madre durante la fase de maduración de las semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En este sentido, Bodrone *et al.* (2017) mostraron que la dormición de los frutos que provenían de plantas cultivadas a alta temperatura se asoció principalmente por una mayor sensibilidad de los frutos al ABA y por una mayor síntesis *de novo* de ABA. En contraposición, Le Page-Degivry *et al.* (1990) y Seiler (1998) demostraron que la adición exógena de GAs<sub>3</sub> al medio de incubación aumentó la germinación de frutos dormidos de girasol. Sin embargo, un aumento en la concentración de esta hormona no es una condición suficiente para que se produzca la salida de la dormición. En este sentido, Steinbach *et al.* (1997) y Benech-Arnold *et al.* (1999) demostraron que la dormición en semillas de sorgo es consecuencia de un balance entre el contenido endógeno de ABA y GAs. En adición a lo anterior Ali-Rachedi *et al.* (2004) señala que además del balance entre ambas hormonas los cambios en la sensibilidad de los tejidos al ABA y GAs juegan un rol importante en la imposición/ruptura de la dormición. Recientemente, se ha demostrado que también ciertos

reguladores del crecimiento (e.g. citocininas, ácido oxo-fitodienoico, ácido jasmónico, ácido jasmónico-isoleucina, 12-OH jasmónico y salicílico) pueden interactuar en forma combinada en el sistema general de imposición y control de la dormición descrito precedentemente (Andrade *et al.* 2015; Roselló *et al.*, 2016 y Penfield y MacGregor, 2017).

La dormición impuesta por las cubiertas podría estar asociada a cambios en su estructura física y/o química (i.e. espesor de las cubiertas seminales y/o contenido de ceras y polifenoles). Así, por ejemplo fotoperíodos largos promueven el desarrollo de cubiertas más duras y/o gruesas en semillas de *Chenopodium álbum*, *Trigonella arabica* y *Ononis sícula* (Karssen, 1970; Gutterman, 1978 y Gutterman & Heydecker 1973 citados Fenner, 1991 respectivamente) que aumentan notablemente el nivel de dormición a cosecha. Ceccato *et al.* (2011) demostraron que en semillas de *Chenopodium quinoa Willd.*, provenientes de cultivos sembrados en una fecha de siembra tardía (i.e. diciembre) tenían cubiertas más finas y menor porcentaje de dormición que las semillas provenientes de la fecha siembra temprana (i.e. noviembre). Lindström *et al.* (2007) demostraron en cultivos de girasol que reducciones en el porcentaje de radiación incidente durante el período de formación del pericarpio (i.e. 15 días antes y 10 días después centrados en anthesis media) modificaban la estructura física del mismo (i.e. número de capas que componen al pericarpio). Los factores del ambiente también modifican la deposición de diversos tipos de compuestos químicos como ceras y polifenoles de diferente nivel de complejidad (por ej. taninos; Penfield y MacGregor, 2017) en la cubiertas de los frutos que afectan el nivel de dormición. Así, por ejemplo Dorne (1981) demostró que las semillas de *Chenopodium bonus-henricus* que crecen en ambientes con alta radiación y baja temperatura presentaron un mayor contenido de polifenoles y un mayor nivel de dormición que las que se cultivaron en ambientes con baja radiación y alta temperatura. Los cambios en la estructura física y/o química de las semillas podrían limitar la salida o metabolización de inhibidores (i.e. ABA) al medio y/o el intercambio gaseoso. Bianco *et al.* (1997), en *Pseudotsuga menziesii*, halló aprox. 20 veces más de ABA en el embrión cuando la semilla estaba intacta en comparación con embriones aislados luego de 7 días de incubación a 23°C. Por su parte, Corbineau *et al.* (1990) sugirieron que las cubiertas seminales podrían afectar el suministro de oxígeno al embrión en frutos de girasol. En este sentido, Bagniol (1987) demostró que la

germinación de frutos maduros de girasol incubados a 25°C mejoraba cuando eran expuestos a una mezcla de gases enriquecida con oxígeno. Por otra parte, Rolletschek *et al.* (2007) demostraron que la concentración interna de oxígeno en frutos de girasol a los 16 días después del cuaje aumenta a medida que se eliminan las cubiertas seminales. Cuando el pericarpio y la membrana seminal estaban intactas la concentración interna de oxígeno fue menor 2  $\mu\text{M}$ , luego al eliminarse el pericarpio la concentración de oxígeno tendió a aumentar ligeramente. Únicamente cuando se eliminó el pericarpio y la membrana seminal la concentración interna de oxígeno aumentó significativamente ( $>120 \mu\text{M}$ ). El ingreso de oxígeno es crucial para la acción de la mono-oxigenasa que cataliza la oxidación del ABA y también son necesarias para la síntesis de GAs (Rademacher, 2000).

La dormición de los frutos de girasol al momento de cosecha, presenta una alta variabilidad interanual, lo que sugiere la existencia de una fuerte componente ambiental en la imposición del nivel de dormición. A pesar de la importancia de este problema para la industria productora de semillas, los efectos del ambiente sobre la dormición han sido escasamente explorados (i.e. altas temperaturas). La falta de información sobre los efectos de los otros factores del ambiente (i.e. radiación y fotoperíodo) limitan cualquier avance que se pretenda realizar para adoptar medidas de manejo que permitan disminuir la variabilidad interanual para este carácter. Debido a e ello, en esta tesis se estudió el efecto de cada uno de estos factores, en experimentos independientes que se realizaron en condiciones hídricas y nutricionales favorables.

## **1.2 OBJETIVOS**

### Objetivo General

- Evaluar y cuantificar el efecto de fotoperíodo y radiación durante la etapa de crecimiento y maduración de los frutos de girasol sobre el nivel de dormición de los mismos a cosecha.

### Objetivos particulares

- Objetivo 1: Estudiar el efecto de la radiación incidente durante el período de crecimiento y maduración de los frutos de girasol sobre el nivel de dormición a cosecha.

- Objetivo 2: Estudiar el efecto del fotoperíodo durante el período de crecimiento y maduración de los frutos de girasol sobre el nivel de dormición a cosecha.
- Objetivo 3: Evaluar en qué medida los efectos sobre el nivel de dormición observados en 1 y 2 se encuentran determinados por (a) cambios en la dormición impuesta por las cubiertas y/o por cambios en la dormición embrionaria, (b) cambios en la estructura física de las cubiertas del fruto (c) cambios en la sensibilidad de los frutos al ABA y/o en el contenido endógeno de ABA de los embriones.

### **1.3 HIPÓTESIS**

- *Hipótesis asociada al objetivo 1:* Una menor cantidad de radiación incidente durante el período de desarrollo y crecimiento de los frutos disminuye el nivel de dormición de los frutos de girasol.
- *Hipótesis asociada al objetivo 2:* Fotoperíodos cortos durante el período de crecimiento y maduración de los frutos disminuyen el nivel de dormición de los frutos de girasol.
- *Hipótesis asociada al objetivo 3:* Los efectos sobre el nivel de dormición observados en 1 y 2 se asocian a: (a) cambios en la dormición impuesta por las cubiertas, (b) cambios en la estructura física de las cubiertas del fruto y (c) cambios en el contenido endógeno de ABA y/o en la sensibilidad de los frutos al ABA.

### **1.4 ESTRUCTURA DE TESIS**

Esta tesis consta de cuatro capítulos de los cuáles el Capítulo 1 y 4 corresponden a la Introducción y a las Conclusiones respectivamente, los resultados de los experimentos realizados se presentan en los dos capítulos restantes. A continuación, se realiza una breve síntesis de los temas abordados en los capítulos de resultados (Capítulos 2 y 3) y en el capítulo final (Capítulo 4).

En el *Capítulo 2* se estudió el efecto del sombreado en diferentes estados de desarrollo y crecimiento del fruto (i.e. desde la etapa final de división celular de las paredes del ovario y hasta que el pericarpio alcanza su máximo peso seco) sobre la dinámica de la salida de la

dormición de los frutos de girasol, en cultivos que crecieron en ausencia de restricciones abióticas (i.e. agua y nutrientes) y bióticas. Se realizó una descripción detallada de la evolución de la germinación en función de los días después de la cosecha y su relación con los cambios en la estructura física de las cubiertas del fruto (i.e. espesor del pericarpio y de la membrana seminal) y en la regulación hormonal (i.e. contenido endógeno de ABA, sensibilidad al ABA, etc.). En este capítulo se da cuenta de un tercer experimento que permitió establecer si el efecto del sombreado sobre el nivel de dormición está ocasionado por una limitación en la fuente y/o en la actividad de los frutos.

En el *Capítulo 3* se describe el efecto de la duración del día durante el período de llenado de los frutos de girasol sobre su patrón de salida de la dormición, en cultivos que crecieron en ausencia de restricciones abióticas (i.e. agua, radiación y nutrientes) y bióticas, y su relación con las estructuras del fruto (i.e., pericarpio, y membrana seminal) y con el contenido y sensibilidad de los frutos al ABA.

En el *Capítulo 4* se integraron los conocimientos generados a partir de los resultados presentados en los capítulos anteriores y se discuten cuáles serían las investigaciones que se deberían realizar en el futuro para resolver las nuevas preguntas que surgieron a partir de esta investigación.

## **CAPÍTULO 2:**

**EFECTO DEL SOMBREO DURANTE EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO DEL  
PERICARPIO SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN DE LOS FRUTOS DE  
GIRASOL**

## 2.1 INTRODUCCIÓN

La información disponible en la bibliografía ha demostrado que el sombreado puede disminuir (Sánchez *et al.*, 1981; Gallagher *et al.*, 2013) o aumentar (Steckel *et al.*, 2003 y Stoller y Myers, 1989) el nivel de dormición de los frutos a cosecha. El efecto de este factor sobre el nivel de dormición depende de la intensidad del sombreado y de la especie considerada. Así, por ejemplo, un sombreado del 50% en *Datura ferox* L (Sánchez *et al.*, 1981) y del 70% en *Avena fatua* L (Gallagher *et al.*, 2013) redujeron el nivel de dormición de las semillas en proporciones similares a la intensidad del sombreado aplicado en cada especie. Mientras que en *Abutilon theophrasti*, un sombreado del 30 y del 76%, tuvieron un bajo impacto (aprox. un 20%) sobre el nivel de dormición (Bello *et al.*, 1995). En el girasol, no hay información bibliográfica acerca de los efectos del sombreado sobre el nivel de dormición de los frutos. Sin embargo, el hecho de que la temperatura explicó sólo el 10% de la variación del nivel de dormición de los frutos de girasol provenientes de diferentes fechas de siembra (Brodone *et al.*, 2017) sugiere que la radiación incidente también podría afectar el nivel de dormición de los frutos de girasol.

El sombreado puede afectar el nivel de dormición debido a una limitación de la fuente y/o de la actividad de los frutos. Oreja (2014) demostraron que un sombreado del 80% sobre las hojas de plantas de *Digitaria sanguinalis* aumentó sólo un 50% el porcentaje de germinación de sus semillas, en comparación con las semillas provenientes de cultivos en los que se sombreado a toda la planta (i.e. canopeo + panoja). En contraposición, en *Datura ferox* el sombreado de los frutos no afectó el porcentaje de germinación. Mientras que, cuando se sombreado el canopeo el porcentaje de germinación de las semillas aumentó (de Miguel citado en Sánchez *et al.*, 1981). En el girasol, existe evidencia que apoya la noción de que el efecto del sombreado sobre el nivel de dormición de los frutos podría estar asociado a una limitación de la fuente y no a la actividad de los destinos. En este sentido, Saranga *et al.* (1998) demostraron que los frutos de girasol provenientes de plantas con una alta relación fuente/destino (i.e. área foliar/número de estructuras reproductivas) eran más pesados, pero con un menor porcentaje de germinación que los frutos provenientes de plantas con una baja relación fuente/destino. Evaluar y comprender las bases fisiológicas de los efectos de

la radiación sobre el nivel de dormición podría generar información útil para implementar medidas de manejo (i.e. fechas de siembra, control de plagas y enfermedades, aplicación de desecantes etc.) que podrían disminuir el nivel de dormición de los frutos de girasol a la cosecha.

La dormición primaria en los frutos de girasol puede tener su origen en el embrión y/o estar impuesta por las cubiertas seminales del fruto (Corbineau *et al.*, 1990; Le Page-Degivry y Garello, 1992). La información disponible en la bibliografía sobre el efecto de las estructuras del fruto (i.e. dormición embrionaria y dormición impuesta por las cubiertas) de girasol en la determinación del nivel de dormición sugiere que ésta podría estar impuesta por las cubiertas cuando la dormición es persistente (Bodrone *et al.*, 2017). Coincidentemente, el menor nivel de dormición de los frutos de girasol a cosecha provenientes de la fecha de siembra tardía del experimento realizado por Bodrone *et al.* (2017) se explicaron también, por una disminución de la dormición impuesta por las cubiertas del fruto.

La dormición impuesta por las cubiertas del fruto puede estar asociada con cambios en la estructura física (i.e. espesor del pericarpio y de la membrana seminal) y/o química (i.e. contenido de compuestos fenólicos) de las cubiertas del fruto que podrían limitar la salida de inhibidores (Bianco *et al.*, 1997) al medio y/o el intercambio gaseoso (Bagniol, 1987 y Saranga *et al.*, 1998). Lindström *et al.* (2007) demostraron que un sombreado del 80% en los diferentes estadios de desarrollo y crecimiento del pericarpio (i.e. desde 15 días previos a antesis hasta 12 días después de fin de antesis) en semillas de girasol reduce el grosor de la pared celular y el número de estratos de la capa media del pericarpio. Adicionalmente, Dorne (1981) demostró que el mayor nivel de dormición de las semillas de *Chenopodium bonus-henricus* que se desarrollaron en ambientes con altos niveles de radiación se explicaron por un mayor grosor de las cubiertas seminales. A diferencia de lo que sucede con el pericarpio, los posibles efectos de un sombreado sobre la morfología de la membrana seminal no están documentados. Sin embargo, existen evidencias de que esta membrana podría tener un efecto “*per se*” en la regulación de la dormición impuesta por las cubiertas en el girasol (Bodrone *et al.*, 2017). La evidencia citada precedentemente sugiere

que los cambios en la anatomía de las cubiertas seminales, ocasionados por una caída en la cantidad de radiación incidente durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio, podrían explicar al menos en parte la reducción en el nivel de dormición impuesto por las cubiertas del fruto entre fechas de siembra reportado por Bodrone *et al.* (2017).

El ABA juega un rol clave en la imposición del nivel de dormición (He *et al.*, 2014 y Roselló *et al.*, 2016). Existen numerosos ejemplos en la bibliografía que muestran la asociación entre las condiciones del ambiente (i.e. disponibilidad hídrica, temperatura, salinidad, nutrientes) y la variación en el contenido de ABA (Roach y Wulf, 1987; Gul y Weber, 1998; Iuchi *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2020a y Kendall *et al.*, 2011) o la sensibilidad de los tejidos de las semillas a esta hormona (Benech Arnold *et al.*, 1991 y 1995). Coincidentemente, Bodrone *et al.* (2017) surgieron que la dormición de los frutos de girasol a cosecha, que provenían de plantas cultivadas a alta temperatura durante el período de llenado de grano, estarían asociadas a un aumento de la sensibilidad al ABA. La evidencia citada precedentemente sugiere que el efecto del ambiente materno sobre el nivel de dormición en frutos de girasol podría estar mediado por el contenido de ABA y/o la sensibilidad a esta hormona. Es importante resaltar que las condiciones del ambiente durante el período de crecimiento de las semillas también pueden afectar el contenido de otras hormonas (i.e. GAs/ etileno) que promueven la germinación. En este sentido, las semillas provenientes de plantas de *Arabidopsis* cultivadas a 15°C duplicaron el contenido de ABA comparado con semillas cultivadas a 22°C, mientras que el contenido de GAs se triplicó (Kendall *et al.*, 2011).

Los objetivos planteados en este capítulo fueron: i) estudiar el efecto del sombreado durante diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio [i.e. desde la última etapa de división celular de las paredes del ovario (i.e. R3, el entrenudo por debajo del botón reproductivo continúa alongándose llevando la inflorescencia a más de 2 cm por encima de las hojas; Schneiter y Miller, 1981), hasta que el pericarpio alcanza su máximo peso seco y finaliza la deposición de la pared secundaria (i.e. R6, aprox. 15 días después de fin de antesis)] sobre la dormición; ii) evaluar en qué medida los efectos sobre el nivel de dormición observados en i) se explican por cambios en la dormición impuesta por las

cubiertas y/o por cambios en la dormición embrionaria; iii) estudiar la posible asociación entre los cambios en la morfología de las cubiertas del fruto (pericarpio y membrana seminal + restos de endosperma) y el nivel de dormición observado en i); iv) determinar en medida los efectos del sombreado observados en i) están asociados al contenido de ABA endógeno y/o a la sensibilidad de las cipselas a las hormonas (i.e. ABA, GAs y Etileno) y v) establecer si los cambios en el nivel de dormición observados en i) son producidos por una limitación en la fuente y/o en la actividad de los frutos.

## 2.2 MATERIALES Y METODOS

### 2.2.1 Sitio y condiciones de crecimiento

En la Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires (34° 35' S 58° 29' O) se realizaron tres experimentos durante las campañas 2010-11, 2011-12 y 2012-13 para determinar el efecto del sombreado durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio (Exp<sub>1</sub> y Exp<sub>2</sub>, campañas 2010-11 y 2011-12 respectivamente) y sobre diferentes estructuras del cultivo (i.e. canopeo y/o fruto; Exp<sub>3</sub>, campaña 2012-13) sobre la salida de la dormición de los frutos de girasol luego de la cosecha. En ambos experimentos se utilizó una línea parental endocriada de girasol (*Helianthus annuus* L.) que presenta altos niveles de dormición a cosecha, pero con una fuerte variación interanual (Fernando Neri, comunicación personal, 5 de junio de 2010). El suelo fue franco arcillo limoso (Argiudol vértico, Taxonomía de suelos USA). Los experimentos se condujeron sin limitaciones hídricas y nutricionales. El contenido de agua en el suelo se mantuvo cerca de capacidad de campo mediante el uso de riego por goteo. Las parcelas recibieron 60 Kg N ha<sup>-1</sup> de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en dos dosis, la primera a la siembra y la otra a los 20 días posteriores a la emergencia. Se controlaron las malezas en forma manual y se realizaron aplicaciones periódicas de insecticidas y fungicidas para mantener las plantas libres de adversidades bióticas. En botón floral (R3, el entrenudo por debajo del botón reproductivo continúa alongándose llevando la inflorescencia a más de 2 cm por encima de las hojas, según la escala de Schneiter y Miller, 1981) se cubrieron los capítulos con bolsas de poliamida blancas para facilitar la autopolinización y evitar los daños ocasionados por pájaros y/o cotorras durante el desarrollo y crecimiento de los frutos. Los Exp<sub>1-2</sub> y Exp<sub>3</sub> se sembraron

en el mes de noviembre (fecha de siembra óptima para esta latitud, Cantagallo *et al.*, 1997) para lograr una alta variación en la cantidad de radiación incidente durante el período de floración y llenado de los frutos entre los controles y los tratamientos de sombreado. La siembra de los experimentos se realizó en forma manual y a chorrillo. La densidad final ( $5.1 \text{ pl.m}^{-2}$  en todos los experimentos) se obtuvo mediante la realización de dos raleos. El primero se realizó inmediatamente después de la emergencia del cultivo y el segundo cuando las plantas presentaban su primer par de hojas expandidas.

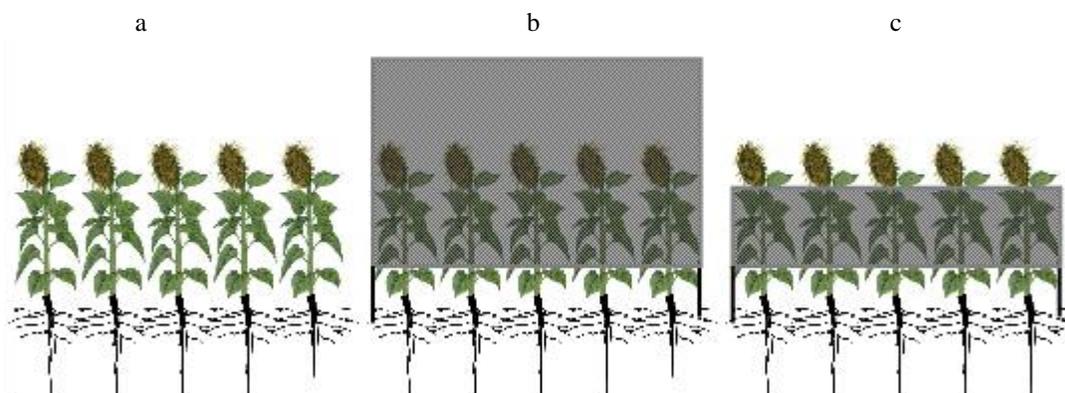
### 2.2.2 Diseño experimental y tratamientos

En los Exp<sub>1-2</sub> se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 3 (2010-11) y 4 (2011-12) repeticiones por tratamiento respectivamente. En el Exp<sub>3</sub> (campana 2012-13) se utilizó el mismo diseño experimental, pero con 3 repeticiones por tratamiento. Las dimensiones de cada parcela en todos los experimentos fueron de  $4 \text{ m}^2$  (3 surcos de 2 m de longitud distanciados a 0.70 m entre surcos). Entre las parcelas se dejaron 3 surcos (aprox. 2 m de distancia) de bordura, de forma tal de evitar interferencias entre los tratamientos impuestos en parcelas linderas. En los Exp<sub>1-2</sub> (Figura 2.1 a) los tratamientos de sombreado consistieron en un nivel normal (100%, control; Figura 2.2 a) o bajo (20%) de radiación incidente aplicado a todo el cultivo (Figura 2.2 b): i) durante 12 días a partir de R3 (i.e. el entrenudo ubicado por debajo de la inflorescencia tiene más de dos centímetros, R<sub>312d</sub>), ii) desde primera antesis a fin de antesis (A) y iii) durante 12 días a partir de fin de antesis (FA<sub>12d</sub>) en el Exp<sub>1</sub>. Mientras que en el Exp<sub>2</sub> los tratamientos de sombreado se aplicaron: i) desde primera antesis a fin de antesis (A), ii) durante 12 días a partir de fin de antesis (FA<sub>12d</sub>) y iii) durante 23 días a partir de primera antesis (PA<sub>23d</sub>). En el Exp<sub>3</sub> (Figura 2.1 b) los tratamientos consistieron en un nivel normal (100%, control; Figura 2.2 a) o bajo (20%) de radiación incidente en: i) todo el cultivo (SOMB<sub>CUL</sub>, Figura 2.2 b) y ii) el canopeo (los capítulos quedaron expuestos al sol; SOMB<sub>CAN</sub>, Figura 2.2 c) durante 12 días desde fin de antesis. Para reducir la radiación incidente en los Exp<sub>1-2</sub> y en el tratamiento SOMB<sub>CUL</sub> del Exp<sub>3</sub> se utilizaron telas de media-sombra negra 80% montadas sobre estructuras de metal rectangulares de 2 metros de alto, ancho y largo y hasta 0.40 metros de distancia del suelo, para mejorar la circulación de aire dentro de la carpa. En el tratamiento SOMB<sub>CAN</sub> del

Exp<sub>3</sub>, la media-sombra cubrió solamente el canopeo hasta 0.40 metros de distancia del suelo dejando los capítulos expuestos a pleno sol (Figuras 2.1 b y 2.2 b).



**Figura 2.1:** Vista aérea de los experimentos de sombreo realizados en diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio (Exp<sub>1-2</sub>, Foto a) y en diferentes estructuras del cultivo (i.e., cultivo y canopeo) durante 12 días desde fin de antesis (Exp<sub>3</sub>, Foto b).



**Figura 2.2:** Representación esquemática de los tratamientos realizados en los experimentos de sombreo realizados en diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio (Exp<sub>1-2</sub>) y en diferentes estructuras de cultivo (i.e. cultivo y canopeo) durante 12 días desde fin de antesis (Exp<sub>3</sub>). Nivel normal (100%) de radiación incidente (controles de los Exp<sub>1-2</sub> y Exp<sub>3</sub>, Figura a) y nivel bajo de radiación incidente (20%) en todo el cultivo (Exp<sub>1-2</sub> y tratamiento SOMB<sub>CUL</sub> del Exp<sub>3</sub>, Figura b) y nivel bajo de radiación incidente (20%) en el canopeo (tratamiento SOMB<sub>CAN</sub> del Exp<sub>3</sub>, Figura c).

## 2.2.3 Mediciones, observaciones y cálculos

### 2.2.3.1 Condiciones ambientales

Previo a la instalación de las carpas en los experimentos detallados en este capítulo se midió la cantidad de radiación incidente fuera y dentro de las carpas con un sensor lineal BarRad 100, Cavadevices, Buenos Aires, Argentina) para confirmar que las telas de media-sombra 80% utilizadas en su construcción, dejaban pasar solo el 20% de la radiación incidente. Luego durante el desarrollo de los cultivos de todos los experimentos

presentados en este capítulo se registraron los valores de temperatura máxima y mínima diaria y de la radiación incidente durante el ciclo del cultivo mediante una estación meteorológica situada a 600 m del campo experimental (SMN, Estación Meteorológica EMA Ortúzar). La temperatura del canopeo se registró cada 30 minutos durante el período de imposición de los tratamientos de sombreado en los Exp<sub>1-2</sub> y Exp<sub>3</sub>, mediante el uso de sensores portátiles (Schwyz DAT-10, Schwyz, Suiza). Los sensores se ubicaron en la parte media del canopeo (i.e. aprox. a un metro de altura de la superficie del suelo) en el surco central de cada parcela y repetición. En el Exp<sub>3</sub>, además se registró la temperatura de los frutos de cuatro capítulos de plantas del control y del tratamiento SOMB<sub>CUL</sub> durante 4 días (cada 30 minutos) durante todo el tratamiento de sombreado mediante el uso de termocuplas (Schwyz, modelo SC138, Schwyz, Suiza).

#### *2.2.3.2 Fenología*

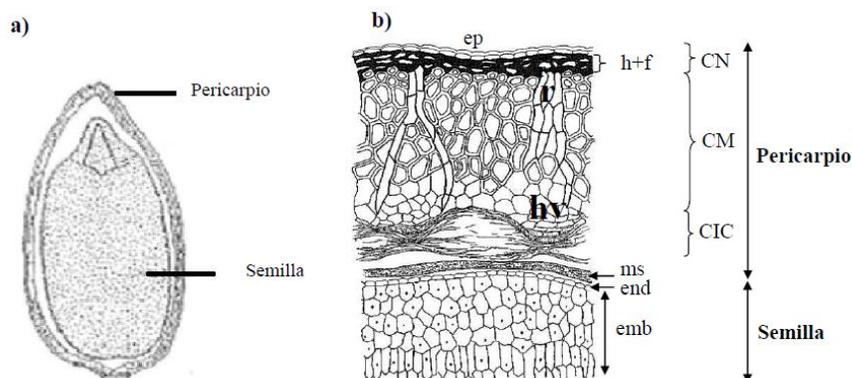
Se registró la fecha de ocurrencia de los siguientes estados fenológicos: emergencia (E), R3 [el entrenado por debajo del botón reproductivo continúa alongándose llevando la inflorescencia a más de 2 cm por encima de las hojas, según la escala de Schneiter y Miller (1981)], primera antesis [PA, estadio R5.1 según la escala de Schneiter y Miller (1981)], antesis media [AM, inicio de antesis, estadio R5.5 según la escala de Schneiter y Miller (1981)] y fin de antesis [FA, la antesis está completa y las flores liguladas pierden turgencia, R6 según la escala de Schneiter y Miller (1981)], madurez fisiológica (MF, estimada como el momento en que los frutos alcanzan un peso estable) y madurez de cosecha (MC, cuando la humedad de los frutos fue cercana al 12%). Para establecer el momento en el que se produce la MF, a partir de FA se cosecharon cada 3-4 días seis frutos de la posición media del capítulo de cuatro plantas en competencia perfecta elegidas al azar de cada tratamiento y repetición. Los frutos se colocaron en estufa a 70°C durante 48 horas y luego se pesaron. Para estimar la MF y la tasa de llenado del grano se utilizó una rutina del TBL curve (Jandel Scientific, 1992) para ajustar una regresión bilineal con un punto de corte desconocido para la relación entre el peso seco del fruto/días a partir de FA según la metodología propuesta por Ploschuk y Hall (1995).

#### *2.2.3.3 Cosecha, acondicionamiento y almacenamiento de los frutos*

El momento de cosecha se determinó de manera similar al utilizado en lotes de producción comercial (i.e. 12% de humedad en el grano). Para disminuir la heterogeneidad en el tamaño de los frutos se cosecharon solamente los frutos provenientes del tercio externo y medio de los capítulos. Luego, mediante el uso de un tamiz de tajo se eliminaron los frutos que tenían un tamaño menor a 2.75 mm. Los frutos de cada tratamiento y repetición se almacenaron en una bolsa de red y se secaron mediante el uso de una secadora experimental de aire forzado con control de temperatura a 36°C, hasta que el porcentaje de humedad de los frutos fue cercano al 6%; según el protocolo de manejo de post-cosecha utilizado en la producción de semilla comercial. Finalmente, los frutos se almacenaron en cámara a 12°C en bolsas de papel.

#### *2.2.3.4 Cubiertas seminales: Breve descripción histológica*

El fruto de girasol está constituido por el pericarpio y la semilla (Figura 2.3 a). Estos componentes tienen orígenes histológicos y dinámicas de crecimiento diferentes (Mantese *et al.*, 2006). El pericarpio de un fruto maduro de girasol está formado por tres capas. La capa más externa, denominada capa oscura (CO, Figura 2.3 b), está constituida por una capa fina de fitomelanina, una epidermis y una hipodermis. La segunda capa, denominada capa media (CM, Figura 2.3 b) está formada por 6-8 estratos de células esclerificadas y está interrumpida a intervalos regulares por radios de naturaleza parenquimática. Los cambios en el espesor del pericarpio tienen su origen en el número de estratos y en el tamaño de la pared celular de las células que componen esta capa (Rondanini *et al.*, 2006; Lindström *et al.*, 2007). La última capa del pericarpio se denomina capa interna comprimida (CIC, Figura 2.3 b) y está constituida por una o dos capas de células con sus haces vasculares fuertemente comprimidos a la madurez de la semilla. La semilla está formada por el embrión, los cotiledones y una membrana seminal (ms, Figura 2.3 b) más restos de endosperma. Esta membrana, que está en contacto con el estrato más interno del pericarpio (i.e. CIC), está formada por una lámina de células delgadas que se caracterizan por poseer un citoplasma rodeado por una pared celular primaria (Anita Ida Mantese, comunicación personal, 15 de diciembre de 2011).



**Figura 2.3:** Sección longitudinal (Esquema a) y transversal (Esquema b) de fruto de girasol a madurez fisiológica. Referencias: capa negra, CN (integrada por la epidermis, ep, la hipodermis y una capa de fitomelanina, h+f); capa media, CM (incluye radios, r y haces vasculares, hv) y capa interna comprimida, CIC; membrana seminal, ms; endorperma, end y embrión, emb. Adaptado de Lindström *et al.* (2000).

### 2.2.3.5 Análisis Histológico de las cubiertas seminales

El espesor del pericarpio se midió en frutos cosechados a MF en los experimentos de sombreado (en todos los tratamientos del Exp<sub>1</sub> y, en el control y FA<sub>12d</sub> del Exp<sub>2</sub>) y estructuras del cultivo (en todos los tratamientos del Exp<sub>3</sub>) mediante la metodología de inclusión en parafina de Johansen (1940). Los frutos se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml conteniendo solución FAA (i.e. formaldehído-alcohol etílico, ácido acético glacial y agua en 2:10:1:7 v/v). Luego, se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes-xilol. Posteriormente, las muestras fueron incluidas en parafina pura. Una vez lograda la solidificación de la parafina se procedió al tallado del bloque. Los bloques de parafina fueron cortados en secciones transversales de 10-15  $\mu\text{m}$  de espesor por medio de un micrótopo rotativo tipo Minot. Las secciones se tiñeron con safranina-fast-green y se montaron con Bálsamo de Canadá sobre portaobjetos. Luego, se tomó una fotografía representativa con una escala de 10X para medir el espesor del pericarpio con una cámara AxioCam HRc anexada a un microscopio óptico marca Zeiss Axioplan (Alemania). Para evaluar los efectos de la radiación sobre la membrana seminal se tomaron fotografías con una escala mayor a la anterior (100X) en los tratamientos control y FA<sub>12d</sub> del Exp<sub>1</sub>. Las fotografías se analizaron mediante el uso del software Zeiss AxioCam ERc 5s (Jena, Alemania). En cada fotografía se realizaron cuatro mediciones del espesor de pericarpio (capa oscura + capa media) y el número de estratos de la capa media. Mientras que, en el caso de la membrana seminal se midió el tamaño (i.e. alto y ancho) de 10 células.

### 2.2.3.6 Control hormonal de la dormición: Contenido de ABA endógeno a cosecha

El contenido de ABA endógeno se evaluó mediante radioinmunoensayo (Steinbach *et al.*, 1995) en todos los tratamientos de los dos experimentos de sombreado realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3 del Exp<sub>1</sub>), A (desde primera antesis a fin de antesis, del Exp<sub>1</sub>) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis, del Exp<sub>1-2</sub>) y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp<sub>2</sub>] de desarrollo y crecimiento del pericarpio. Un grupo de los frutos acondicionados a cosecha de cada tratamiento y repetición (ver apartado 2.2.3.3) fueron congelados en nitrógeno líquido durante 30 segundos y almacenados en un freezer a -80°C hasta su medición. Para ello, se extrajeron 25 semillas de cada tratamiento y repetición se liofilizaron, molieron, pesaron y luego se les agregó agua (24 µl por mg de peso seco) para extraer el ABA. Los valores se expresaron en picogramos de ABA por miligramo de peso seco (pg ABA/ mg peso seco).

### 2.2.3.7 Control hormonal de la dormición: Sensibilidad al ABA, GAs y Etileno

La sensibilidad al ABA, a las GAs, y al Etileno se evaluó a los 96 días después de la cosecha en todos los tratamientos [A (desde primera antesis a fin de antesis), FA<sub>12d</sub> (12 días a partir fin de antesis), PA<sub>23d</sub> (23 días a partir de primera antesis)] de sombreado del Exp<sub>2</sub>. El Fluridone, Paclobutrazol y NBD son inhibidores de la síntesis de ABA, GAs y Etileno respectivamente. La inclusión de estos inhibidores en el medio de incubación tuvo como objetivo evitar la síntesis *de novo* de sus respectivas hormonas durante la incubación, de manera de evaluar únicamente la concentración agregada en forma exógena. Debido a que el Fluridone no eliminó las diferencias en el PG en agua entre los diferentes tratamientos de sombreado la sensibilidad al ABA se evaluó nuevamente a 141 días después de la cosecha.

Los medios de incubación utilizados fueron:

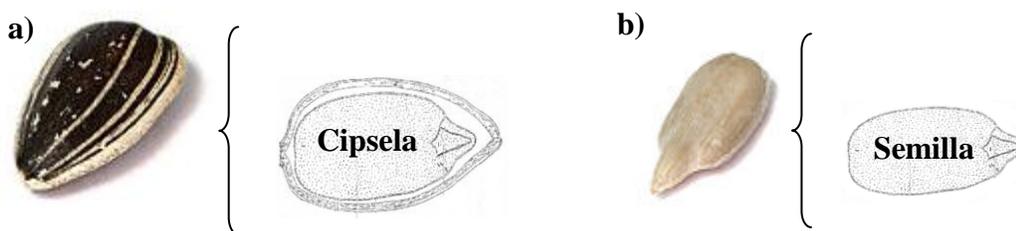
- *Sensibilidad al ABA*: i) Agua destilada; ii) Agua destilada + Fluridone 100 µM; iii) Agua destilada + Fluridone 100 µM + ABA 10 µM; y iv) Agua destilada + Fluridone 100 µM + ABA 100 µM.

- *Sensibilidad a las GAs*: i) Agua destilada; ii) Agua destilada + Paclobutrazol 100  $\mu\text{M}$ ; iii) Agua destilada + Paclobutrazol 100  $\mu\text{M}$  + GAs 10  $\mu\text{M}$ ; iv) Agua destilada + Paclobutrazol 100  $\mu\text{M}$  + GAs 100  $\mu\text{M}$ ;

- *Sensibilidad al Etileno*: i) Agua destilada; ii) Agua + NBD 100  $\mu\text{M}$ ; iii) Agua + NBD 100  $\mu\text{M}$  + Ethephon 10  $\mu\text{M}$ ; iv) Agua + NBD 100  $\mu\text{M}$  + Ethephon 100  $\mu\text{M}$ .

#### 2.2.4 Experimentos de germinación

Para evaluar la evolución del porcentaje de germinación se realizaron test de germinación de las cipselas cada 20-30 días a partir del momento de cosecha y hasta que la proporción de frutos que germinaban era igual o superior al 85% (según las reglas de ensayos de semillas de ISTA, Resolución 2270/93 del INASE - SAGPyA). Para evaluar el efecto de las cubiertas seminales sobre la imposición de la dormición se realizaron test de germinación con el fruto completo (i.e. cipsela; Figura 2.4 a) y con la semilla (i.e. cipsela sin pericarpio; Figura 2.4 b). El pericarpio se removió mediante un corte en la región micropilar con un bisturí.



**Figura 2.4:** Foto y esquema del fruto (cipsela, esquema a) y la semilla (cipsela sin pericarpio, esquema b) de girasol a cosecha.

Los test de germinación se realizaron sobre cajas de Petri plásticas de 90 mm de diámetro. En cada caja, sobre dos capas de papel de filtro a las cuáles se les agregó 4 ml agua destilada o soluciones de hormonas puras y/o combinadas, se dispusieron 25 cipselas o semillas elegidas al azar del grupo de frutos de cada tratamiento y repetición. Posteriormente, se sellaron con film adherente para evitar pérdidas de agua por evaporación. Por último, las cajas se colocaron en cámaras de germinación (con una variación de temperatura de  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) en oscuridad. En el Exp<sub>1</sub> se utilizaron dos temperaturas de incubación (i.e. 12 y 25°C), debido a que la dormición embrionaria y la impuesta por las

cubiertas se expresa en diferentes rangos de temperatura (Corbineau *et al.*, 1988 y 1990; Benech-Arnold, 2004 y Ceccato *et al.*, 2011). Dado que en el Exp<sub>1</sub> las diferencias en PG se expresaron a 25°C, en el Exp<sub>2</sub> y en el Exp<sub>3</sub> las cipselas y semillas se incubaron solo a 25°C. Día por medio, por un lapso de 15 días se realizaron recuentos de germinación, se retiraron las cipselas y/o semillas que germinaron y se registró el porcentaje de germinación (PG) final. Se consideró que una cipsela había germinado cuando se observó la protrusión de la radícula, mientras que en el caso de las semillas se consideró que habían germinado cuando la radícula se hizo visible (i.e.  $\approx 3$  mm).

### 2.2.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de variancia para todos los atributos medidos y estimados en este capítulo mediante el uso del paquete estadístico InfoStat (InfoStat versión libre 2009, Di Rienzo *et al.*, 2012). La significancia entre las medias se evaluó mediante los test de Tukey y DGC (Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves). Antes de realizar los análisis de variancia se chequeó que los datos cumplieran con los supuestos (homogeneidad de la varianza, observaciones independientes, distribución normal) de este análisis estadístico. En los casos en que los datos no los cumplieron se utilizó la transformación arcoseno (Little y Hills, 1975). Una vez realizada la transformación de los datos se hicieron nuevamente los test para determinar si los datos transformados cumplían con estos supuestos. Los valores de las variables en las figuras y tablas corresponden a los porcentajes previos a la transformación. Para evaluar el efecto de la radiación incidente sobre la salida de la dormición de las cipselas de girasol se estimó el número de días necesarios para alcanzar el 50% de germinación (PG<sub>50</sub>). Para ello se utilizaron funciones lineales, bilineales, cuadráticas, exponenciales o sigmoideas ajustadas de acuerdo con la naturaleza de los datos entre el PG y los días después de la cosecha.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Efecto del sombreado durante diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio sobre la dormición de los frutos.

#### 2.3.1.1 Condiciones de crecimiento

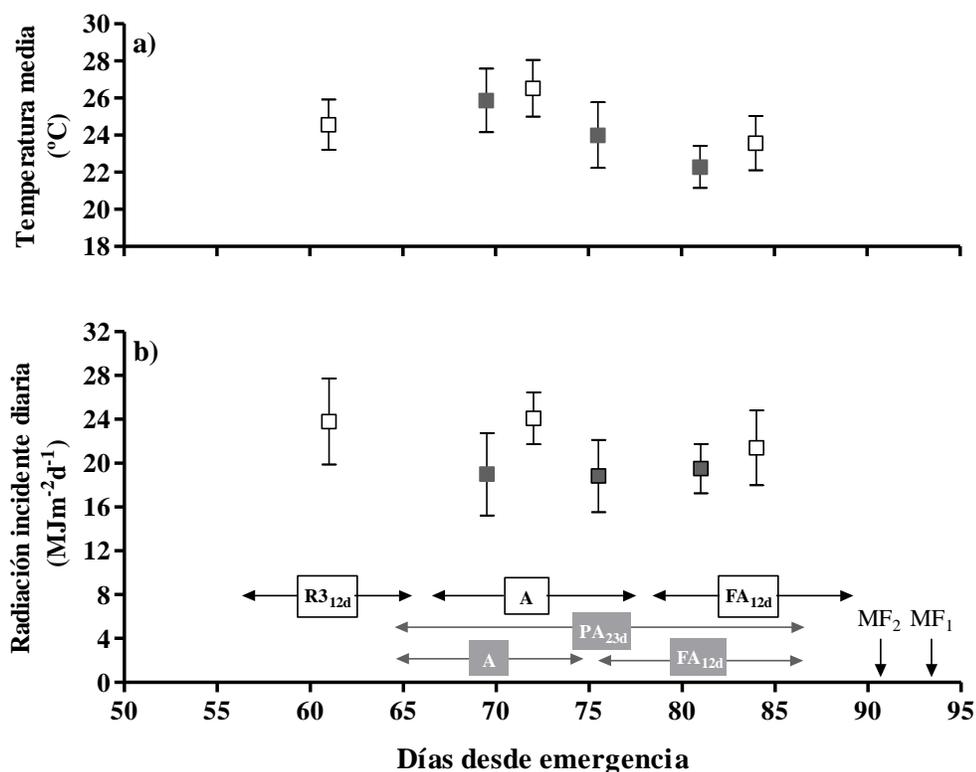
La duración de las fases de siembra-antesis (S-An) y de antesis-madurez fisiológica (An-MF) fue similar en ambos experimentos debido a que los cultivos estuvieron expuestos en ambas fases de desarrollo a un régimen térmico (temperaturas mínimas y máximas) similar (Tabla 2.1). En contraposición, la radiación incidente fue mayor ( $\approx 20\%$ ) durante la etapa An-MF en el Exp<sub>1</sub> comparado con el Exp<sub>2</sub> (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1:** Datos meteorológicos promedio y duración de las fases de Siembra-Antesis (S-An) y Antesis-Madurez Fisiológica (An-MF) de los experimentos de sombreado (Exp<sub>1-2</sub>). Fotoperíodo (Fotop, hs), temperatura máxima media (Tmáx., °C), temperatura mínima media (Tmín., °C) y radiación incidente diaria (RI, MJ m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup>). Datos de la Estación Meteorológica EMA Ortúzar, ubicada a 600 metros de los experimentos.

Experimento	Fases de desarrollo del cultivo	Fotop. (hs)	Tmáx (°C)	Tmín (°C)	RI (MJ m <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> )
Exp <sub>1</sub>					
Fecha de siembra (10 de noviembre)	S - An (73 días)	15.3 ± 0.2	29.1 ± 3.8	18.6 ± 3.5	24.0 ± 5.5
	An - MF (29 días)	14.6 ± 0.3	30.1 ± 3.2	20.3 ± 2.6	22.8 ± 4.9
Exp <sub>2</sub>					
Fecha de siembra (2 de diciembre)	S - An (70 días)	15.2 ± 0.3	30.2 ± 3.5	19.6 ± 3.1	24.0 ± 5.6
	An - MF (32 días)	13.9 ± 0.3	29.2 ± 2.9	19.5 ± 2.7	18.5 ± 5.3

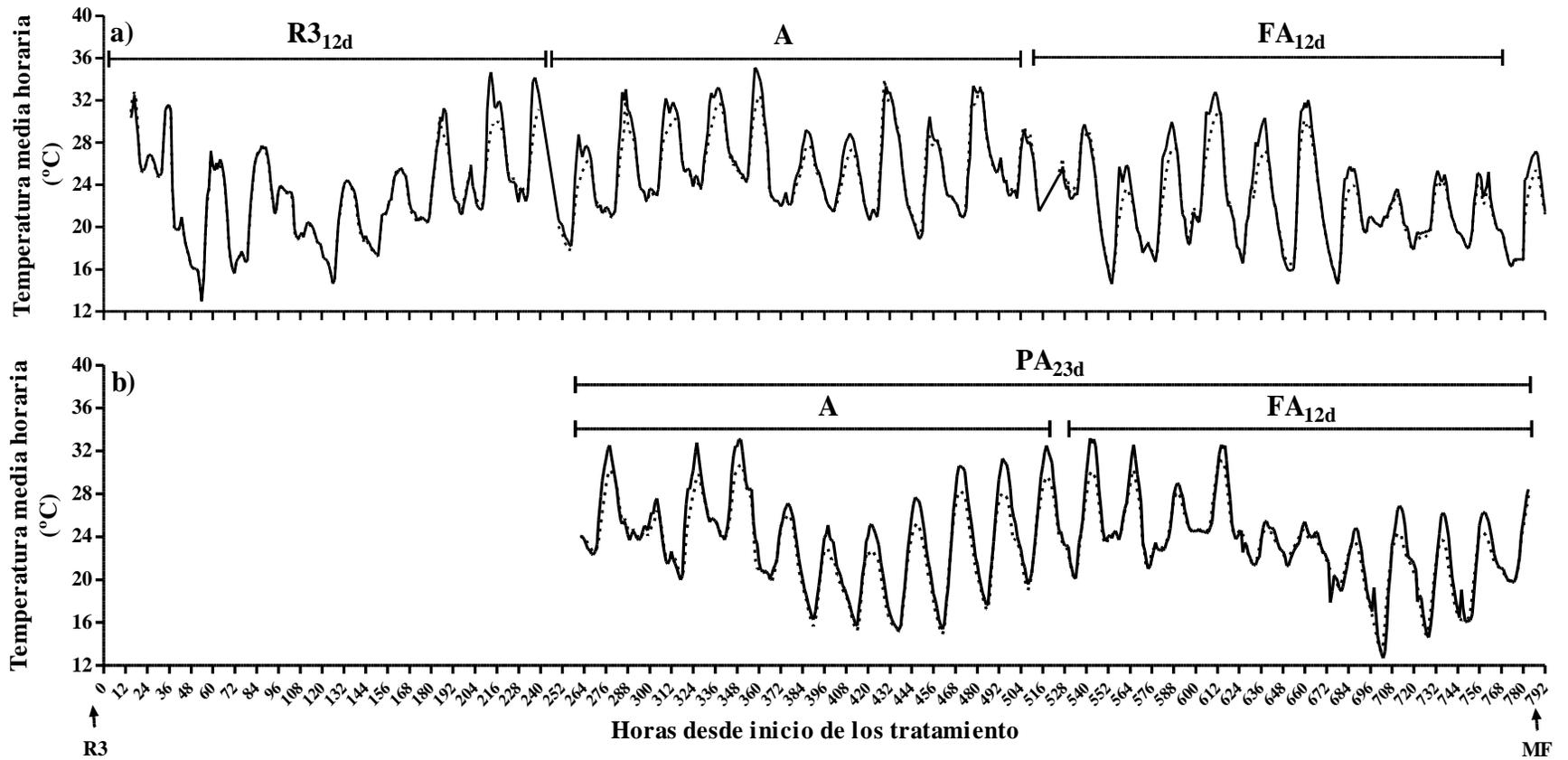
### 2.3.1.2 Caracterización del ambiente durante la imposición de los tratamientos de sombreado

La medición de la cantidad de radiación incidente fuera y dentro de las carpas confirmó que la cantidad de radiación incidente en los tratamientos de sombreado (i.e. en las carpas) fue un 20% de la radiación incidente correspondiente a los controles. La temperatura media de los controles durante la imposición de los tratamientos de sombreado realizados en R3<sub>12d</sub> y A en el Exp<sub>1</sub> y Exp<sub>2</sub> respectivamente, fue ligeramente superior a la registrada en los restantes tratamientos de sombreado (Figura 2.5 a). Mientras que, la radiación incidente diaria fue similar entre los distintos tratamientos de sombreado en ambos experimentos (Figura 2.5 b).



**Figura 2.5:** Temperatura media (°C, Figura a) y radiación incidente diaria ( $\text{MJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ , Figura b) de los controles durante el período de aplicación de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp<sub>2</sub>] de desarrollo y crecimiento del pericarpio en el Exp<sub>1</sub> (cuadrados vacíos) y en el Exp<sub>2</sub> (cuadrados llenos). Las líneas verticales sobre los símbolos indican  $\pm$  un error estándar de la media. Las líneas horizontales en la Figura b indican el tratamiento y la duración de cada tratamiento de sombreo respectivamente en el Exp<sub>1</sub> (cajas vacías) y en el Exp<sub>2</sub> (cajas grises). Las flechas verticales sobre el eje x indican el momento en el que se produjo la madurez fisiológica (MF<sub>1</sub> y MF<sub>2</sub> en el Exp<sub>1</sub> y en el Exp<sub>2</sub> respectivamente). Datos de la Estación Meteorológica EMA Ortúzar ubicada a 600 metros de los experimentos.

La dinámica de la temperatura media horaria del canopeo durante la imposición de los tratamientos de sombreo siguió un patrón similar al registrado en los controles de ambos experimentos (Figura 2.6). Ambas dinámicas se separaron durante las horas del mediodía, la temperatura media de 10 a 14 horas fue en promedio de 1 a 3°C inferior en los tratamientos de sombreo comparado con los controles (Figura 2.6). Sin embargo, estas diferencias no fueron consistentes durante todo el período de aplicación de los tratamientos (Figura 2.6). Es probable que, por este motivo no se hayan detectado diferencias significativas entre la temperatura media, máxima y mínima diaria durante la imposición de los tratamientos de sombreo y los controles en ambos experimentos (Tabla 2.2).



**Figura 2.6:** Temperatura media horaria del aire medida en el canopeo del control (línea continua) y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp<sub>2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub> (Figura a) y Exp<sub>2</sub> (Figura b).

**Tabla 2.2:** Temperatura media, máxima media, mínima media y media de 10-14 hs (°C) del control y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp<sub>2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en los Exp<sub>1-2</sub>. Las medias  $\pm$  un error estándar seguidas letras similares indican que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el control y cada tratamiento de sombreado. Datos obtenidos con los sensores portátiles ubicados en el canopeo de los cultivos.

Experimento	Tratamiento							
	control	R3 <sub>12d</sub>	control	A	control	FA <sub>12d</sub>	control	PA <sub>23d</sub>
Exp <sub>1</sub>								
Temp. Media Diaria	24 $\pm$ 0.9 a	23 $\pm$ 0.9 a	26 $\pm$ 0.5 a	25 $\pm$ 0.5 a	23 $\pm$ 0.5 a	22 $\pm$ 0.6 a	-	-
Temp. Máx. Diaria	29 $\pm$ 1.1 a	28 $\pm$ 1.0 a	31 $\pm$ 0.8 a	30 $\pm$ 0.8 a	28 $\pm$ 0.9 a	26 $\pm$ 0.8 a	-	-
Temp. Mín. Diaria	19 $\pm$ 1.2 a	19 $\pm$ 1.2 a	21 $\pm$ 0.5 a	21 $\pm$ 0.5 a	17 $\pm$ 0.6 a	17 $\pm$ 0.6 a	-	-
Temp. Media 10 a 14 hs	27 $\pm$ 1.5 a	26 $\pm$ 1.0 a	30 $\pm$ 1.0 a	29 $\pm$ 0.9 a	26 $\pm$ 0.9 a	25 $\pm$ 0.7 a	-	-
Exp <sub>2</sub>								
Temp. Media Diaria	-	-	24 $\pm$ 0.7 a	23 $\pm$ 0.7 a	24 $\pm$ 0.7 a	23 $\pm$ 0.8 a	24 $\pm$ 0.5 a	23 $\pm$ 0.5 a
Temp. Máx. Diaria	-	-	29 $\pm$ 0.9 a	28 $\pm$ 1.0 a	29 $\pm$ 0.9 a	27 $\pm$ 1.0 a	29 $\pm$ 0.7 a	27 $\pm$ 0.6 a
Temp. Mín. Diaria	-	-	19 $\pm$ 0.8 a	19 $\pm$ 0.9 a	19 $\pm$ 1.0 a	19 $\pm$ 1.0 a	19 $\pm$ 0.7 a	19 $\pm$ 0.7 a
Temp. Media 10 a 14 hs	-	-	29 $\pm$ 0.9 a	26 $\pm$ 1.1 a	27 $\pm$ 1.0 a	25 $\pm$ 1.0 a	28 $\pm$ 0.7 a	26 $\pm$ 0.6 a

### 2.3.1.3 Dinámica del crecimiento y peso del fruto a madurez fisiológica

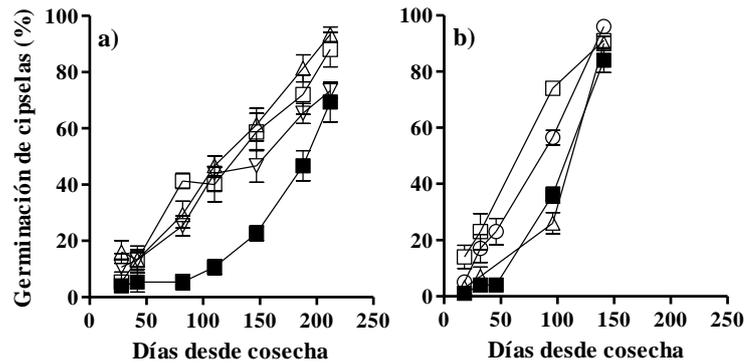
El momento en el que se realizó el sombreado tuvo una fuerte influencia sobre el peso de los frutos. El peso del fruto no se modificó en forma significativa ( $p > 0.05$ ) cuando el sombreado se realizó durante R3<sub>12d</sub> y A en los Exp<sub>1</sub> y Exp<sub>2</sub> respectivamente. En contraposición, el peso del fruto se redujo en forma significativa ( $p < 0.05$ ) cuando los cultivos se sombrearon en FA<sub>12d</sub> para los Exp<sub>1-2</sub> y en PA<sub>23d</sub> para el Exp<sub>2</sub> (Tabla 2.3). Las diferencias en el peso del fruto entre los tratamientos de sombreado y el control durante esta etapa se produjeron debido a una menor tasa de acumulación de materia seca en el fruto y no a una menor duración del período de llenado de fruto (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3:** Peso final y sus determinantes (i.e. tasa y duración del período de llenado de fruto) del control y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp<sub>2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en los Exp<sub>1-2</sub>. Coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de la función de ajuste del peso de fruto en función de los días después de antesis del control y de los tratamientos de sombreado. Las medias  $\pm$  un error estándar seguidas por letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para cada experimento.

Experimento	Tratamiento	Peso final del grano (mg)	Tasa de llenado (mg.día <sup>-1</sup> )	Duración del período de llenado (días)	R <sup>2</sup>
Exp <sub>1</sub>	control	62.3 ± 7.2 a	2.6 ± 0.2 a	26.5 ± 0.8 ab	0.92
	R3 <sub>12d</sub>	57.7 ± 6.7 ab	1.9 ± 0.3 b	29.1 ± 1.9 a	0.75
	A	48.1 ± 5.0 ab	1.9 ± 0.2 b	26.8 ± 1.0 a	0.90
	FA <sub>12d</sub>	43.4 ± 3.8 b	1.9 ± 0.2 b	23.4 ± 0.9 b	0.86
Exp <sub>2</sub>	control	61.5 ± 4.0 a	3.2 ± 0.5 a	28.8 ± 1.2 a	0.86
	A	52.8 ± 7.2 ab	1.3 ± 0.2 b	34.2 ± 1.9 a	0.76
	FA <sub>12d</sub>	49.9 ± 5.6 b	1.2 ± 0.4 b	35.3 ± 4.1 a	0.47
	PA <sub>23d</sub>	47.3 ± 2.5 b	1.5 ± 0.4 b	34.7 ± 2.9 a	0.59

#### 2.3.1.4 Evolución del porcentaje de germinación en función de los días después de la cosecha

La evolución del porcentaje de germinación (PG) de cipselas incubadas a 25°C provenientes del control y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio puso en evidencia que la radiación incidente afectó la tasa de salida de la dormición (Figura 2.7). A partir del día 50 y hasta los 200 días desde la cosecha el PG de las cipselas de los tratamientos de sombreo fueron significativamente mayores que el PG del control ( $p < 0.05$ , Figura 2.7 a) en el Exp<sub>1</sub>. Durante este período la brecha entre el PG de los tratamientos de sombreo y el control fue en promedio de un 30%, a favor de los primeros. A partir de los 150 días desde la cosecha, el PG de las cipselas del control aumentó en forma exponencial de forma tal que, a los 200 días desde la cosecha las diferencias entre el control y los tratamientos de sombreo no fueron significativas ( $p > 0.05$ ). En el Exp<sub>2</sub>, el PG de las cipselas incubadas a 25°C de los tratamientos de sombreo impuestos durante FA<sub>12d</sub> y PA<sub>23d</sub> fue significativamente más alto que el PG del control desde los 50 y hasta los 150 días desde la cosecha (Figura 2.7 b). Sin embargo, y a diferencia de lo que sucedió en el Exp<sub>1</sub>, no se registraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento de sombreo realizado durante anthesis (A).

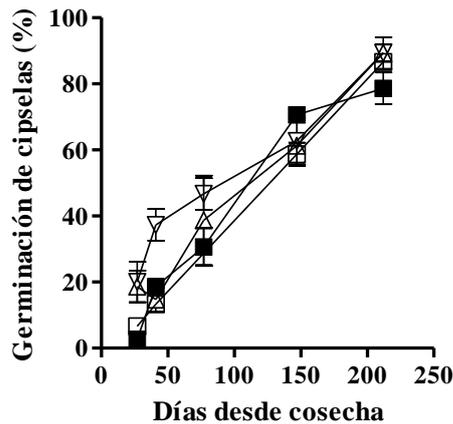


**Figura 2.7:** Evolución del porcentaje de germinación de cipselas incubadas a 25°C en función de los días después de la cosecha del control (cuadrados llenos) y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3, triángulos vacíos invertidos) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis, triángulos vacíos) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis, cuadrados vacíos) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis, círculos vacíos) en el Exp<sub>2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub> (Figura a) y del Exp<sub>2</sub> (Figura b). El porcentaje de germinación de las cipselas se evaluó hasta que alcanzó un valor  $\geq 85\%$ . Las líneas verticales sobre los símbolos indican  $\pm$  un error estándar de la media y se muestran solamente cuando su valor excede el tamaño de los símbolos.

El análisis de varianza del número de días necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG<sub>50</sub>) en cipselas incubadas a 25°C en ambos experimentos, mediante el uso de funciones ajustadas del PG/ddc, confirmó que la radiación incidente durante el período de desarrollo y crecimiento del pericarpio afectó la salida de la dormición. El PG<sub>50</sub> de las cipselas de los tratamientos de sombreado fue significativamente inferior al PG<sub>50</sub> de los controles en ambos experimentos (Tabla 2.4). La única excepción a este resultado fue el tratamiento de sombreado realizado durante antesis (A) del Exp<sub>2</sub>, el PG<sub>50</sub> fue similar al del control. Coincidentemente, la diferencia entre la cantidad de días para alcanzar un PG<sub>50</sub> de los controles de ambos experimentos (i.e. 189.4 y 117.3 días del Exp<sub>1</sub> y Exp<sub>2</sub> respectivamente; Tabla 2.4) se explicaron, al menos en parte, por la menor cantidad de radiación incidente durante el periodo de An-MF entre experimentos (Figura 2.5).

**Tabla 2.4:** Funciones ajustadas a la relación entre el porcentaje de germinación (PG) y los días después de la cosecha (ddc); y el número de días después de la cosecha necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG<sub>50</sub>, estimada con la función de ajuste entre el PG/ddc) del control y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp<sub>2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio incubados a 25°C (Exp<sub>1</sub> y Exp<sub>2</sub>) y a 12°C (Exp<sub>1</sub>). A la derecha de las funciones ajustadas se detalla el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) y el número de observaciones usado en cada función de ajuste. Las medias  $\pm$  un error estándar del PG<sub>50</sub> seguidas por letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para cada experimento y temperatura de incubación.

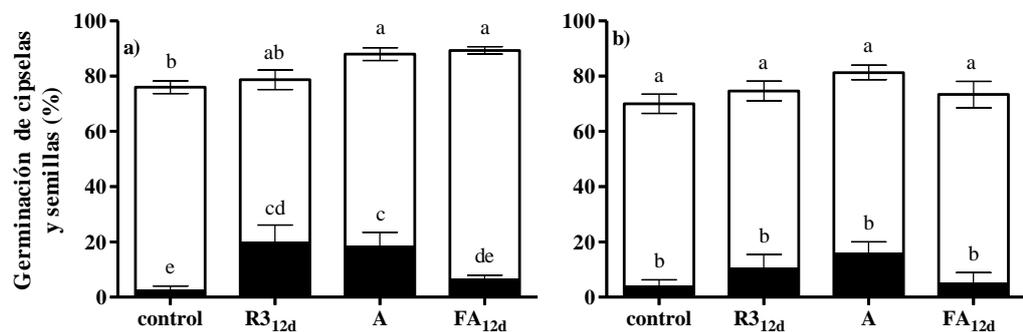
Temperatura de Incubación	Experimento Tratamiento	Función ajustada, R <sup>2</sup> y n	PG <sub>50</sub> (días)		
25°C	Exp <sub>1</sub>	control	PG <sub>50</sub> = 3.8 + 101.3/(1 + exp(-(x-195.5)/31.7)); R <sup>2</sup> : 0.96; n=24	189.4 ± 3.2 a	
		R3 <sub>12d</sub>	PG <sub>50</sub> = -2.2 + 0.4 x; R <sup>2</sup> : 0.93; n=24	140.9 ± 17.1 b	
		A	PG <sub>50</sub> = -0.3 + 0.4 x; R <sup>2</sup> : 0.94; n=24	121.6 ± 14.2 b	
		FA <sub>12d</sub>	PG <sub>50</sub> = -1.4 + 0.4 x; R <sup>2</sup> : 0.92; n=24	129.4 ± 17.9 b	
	Exp <sub>2</sub>	control	PG <sub>50</sub> = 3.2 + 2.9.10 <sup>-5</sup> x <sup>3</sup> ; R <sup>2</sup> : 0.97; n=20	117.3 ± 2.9 a	
		A	PG <sub>50</sub> = 3.0 + 3.1.10 <sup>-5</sup> x <sup>3</sup> ; R <sup>2</sup> : 0.97; n=16	115.4 ± 3.4 a	
		FA <sub>12d</sub>	PG <sub>50</sub> = 3.7 + 0.7 x; R <sup>2</sup> : 0.94; n=16	71.5 ± 11.0 b	
		PA <sub>23d</sub>	PG <sub>50</sub> = -8.6 + 0.7 x; R <sup>2</sup> : 0.96; n=20	81.4 ± 7.8 b	
	12°C	Exp <sub>1</sub>	control	PG <sub>50</sub> = 1.0 + 0.4 x; R <sup>2</sup> : 0.91; n=18	135.0 ± 22.0 a
			R3 <sub>12d</sub>	PG <sub>50</sub> = 19.3 + 0.3 x; R <sup>2</sup> : 0.89; n=18	102.5 ± 22.1 a
A			PG <sub>50</sub> = 7.5 + 0.3 x; R <sup>2</sup> : 0.86; n=18	126.2 ± 27.5 a	
FA <sub>12d</sub>			PG <sub>50</sub> = -3.2 + 0.4 x; R <sup>2</sup> : 0.98 ; n=15	134.6 ± 12.9 a	



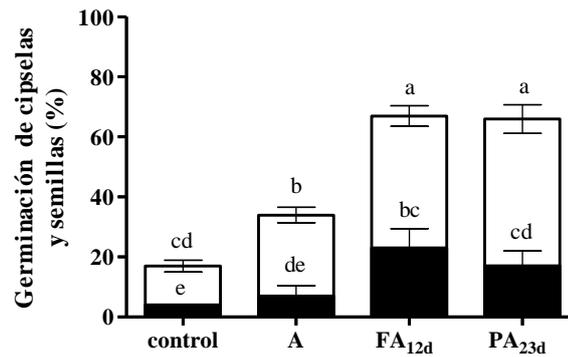
**Figura 2.8:** Evolución del porcentaje de germinación de cipselas incubadas a 12°C en función de los días después de la cosecha provenientes del control (cuadrados llenos) y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3, triángulos vacíos invertidos); A (desde primera antesis a fin de antesis, triángulos vacíos) y en FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis, cuadrados vacíos)] durante el crecimiento y desarrollo del pericarpio del Exp<sub>1</sub>. El porcentaje de germinación de las cipselas se evaluó hasta que alcanzó un valor  $\geq 85\%$ . Las líneas verticales sobre los símbolos indican  $\pm$  un error estándar de la media, y solamente se muestran cuando su valor excede el tamaño de los símbolos.

Debido a que las diferencias en el PG<sub>50</sub> entre el control y los tratamientos de sombreo se expresaron en las cipselas incubadas a 25°C (Figura 2.7 a) y no a 12°C (Figura 2.8 y Tabla 2.4) en el Exp<sub>1</sub>, sugieren que la dormición estaría principalmente impuesta por las cubiertas del fruto. La realización de un test de partes (i.e. cipselas y semillas) confirmó esta aseveración. A los 27 días después de la cosecha, el PG de las cipselas incubadas a 12 y 25°C fue en promedio de un 15 %. Sin embargo, cuando se

incubaron las semillas (i.e. sin el pericarpio) el PG fue del 75% ó más, en todos los tratamientos y en ambas temperaturas de incubación (Figura 2.9). Además, la incubación de las semillas a 12°C puso en evidencia que la radiación también afectó levemente la dormición embrionaria. El PG de las semillas de los tratamientos de sombreado realizados durante A y FA<sub>12d</sub> fue significativamente mayor que el control (Figura 2.9 a). Mientras que el tratamiento de sombreado realizado durante R3<sub>12d</sub> presentó un PG intermedio entre los otros dos tratamientos de sombreado y el control. Estas diferencias desaparecieron cuando las semillas se incubaron a 25°C (Figura 2.9 b). Coincidentemente, a los 32 días después de la cosecha, el PG de las semillas y de las cipselas incubadas a 25°C de los tratamientos de sombreado realizados durante FA<sub>12d</sub> y PA<sub>23d</sub> del Exp<sub>2</sub> mostraron que la dormición estuvo principalmente impuesta por las cubiertas (Figura 2.10). A diferencia de lo descrito para las semillas del Exp<sub>1</sub>, el PG del control (20%) y del tratamiento de sombreado realizado durante A (35%) de las semillas incubados a 25°C del Exp<sub>2</sub> fue significativamente inferior al correspondiente a los otros dos tratamientos de sombreado (aprox. 70%; Figura 2.10).



**Figura 2.9:** Porcentaje de germinación de cipselas (barras negras) y semillas (barras blancas) incubadas a 12°C (Figura a) y 25°C (Figura b) a los 27 días después de la cosecha del control y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados (R3<sub>12d</sub>, durante 12 días a partir de R3; A, desde primera antesis a fin de antesis; y FA<sub>12d</sub>, durante 12 días a partir fin de antesis) durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub>. Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras negras y blancas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos y entre las estructuras del fruto (i.e. cipsela y semilla) para cada temperatura de incubación.

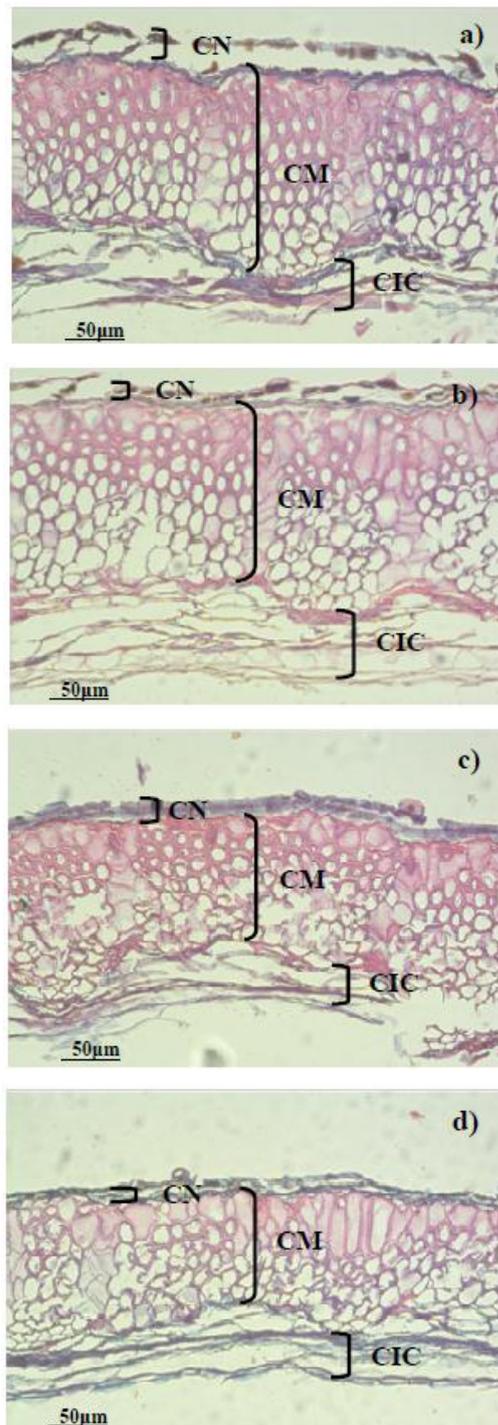


**Figura 2.10:** Porcentaje de germinación de cipselas (barras negras) y semillas (barras blancas) a los 32 días después de la cosecha incubadas a 25°C del control y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados (A, desde primera antesis a fin de antesis; FA<sub>12d</sub>, durante 12 días a partir fin de antesis y PA<sub>23d</sub>, durante 23 días a partir de primera antesis) durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en el Exp<sub>2</sub>. Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras negras y blancas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos y entre las estructuras del fruto (i.e. cipsela y semilla).

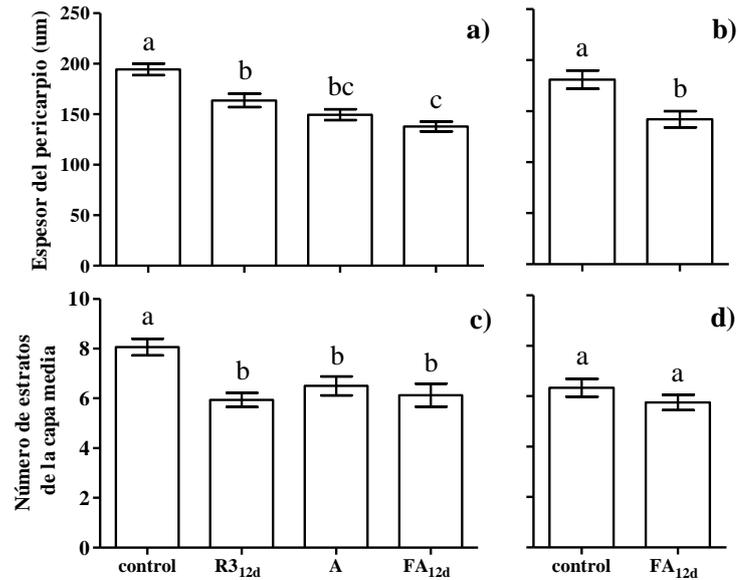
### 2.3.1.5 Morfología de las cubiertas seminales

La evaluación de las características morfológicas del pericarpio (i.e. espesor y número de estratos de la capa media) y de la membrana seminal (i.e. ancho y largo de las células que la componen) en los tratamientos de sombreo realizados en diferentes estados (desde R3 hasta 12 días después de antesis) durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en el Exp<sub>1</sub> demostraron que una menor oferta de radiación afectó la morfología del pericarpio, pero no la membrana seminal. El ancho del pericarpio (i.e. capa oscura+ capa media) fue significativamente menor en los tratamientos de sombreo comparado con el control (Figuras 2.11 y 2.12 a). A medida que el sombreo se aplicó más tardíamente el pericarpio fue más delgado (i.e. 16, 23 y 29% en R3<sub>12d</sub>, A y FA<sub>12d</sub>) en el Exp<sub>1</sub>. Si bien la cantidad de estratos de la capa media de los tratamientos de sombreo fue significativamente inferior al control ( $p > 0.0001$ ) no se detectaron diferencias significativas para esta variable entre los diferentes tratamientos de sombreo (Figura 2.12 c). En el Exp<sub>2</sub>, la realización de cortes histológicos del pericarpio en el control y en el tratamiento de sombreo FA<sub>12d</sub> confirmaron los resultados descriptos en el Exp<sub>1</sub> (Figura 2.12 b y d). El espesor del pericarpio fue significativamente menor en FA<sub>12d</sub> comparado con el control (Figura 2.12 b). No obstante, no se registraron diferencias significativas en el número de estratos de la capa media entre ambos tratamientos (Figura 2.12 d). A diferencia de lo expuesto para el pericarpio, como en fue observado en el experimento anterior, una menor oferta de radiación no afectó la membrana seminal. No se produjeron cambios significativos en el ancho y el largo de

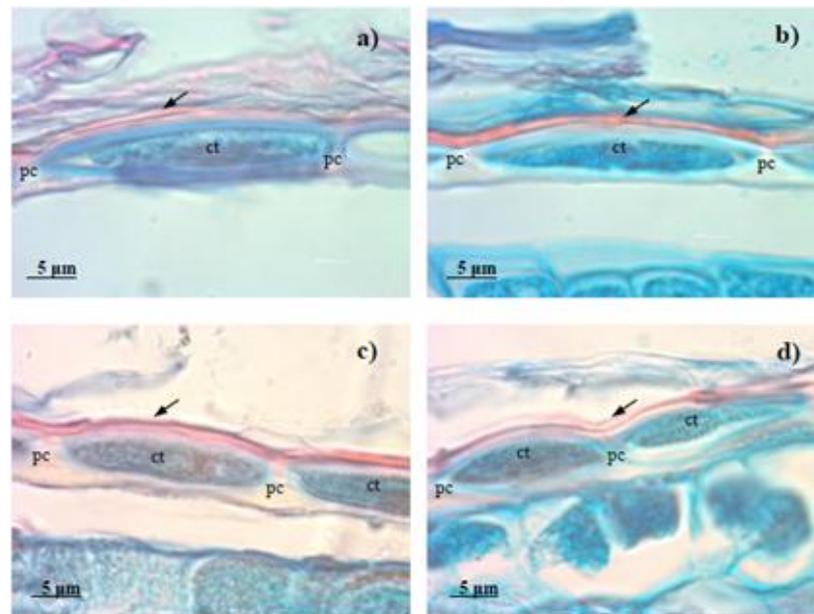
las células que conforman la membrana seminal del control y FA<sub>12d</sub> ( $p > 0.05$  para ambas variables, Figura 2.13 y 2.14).



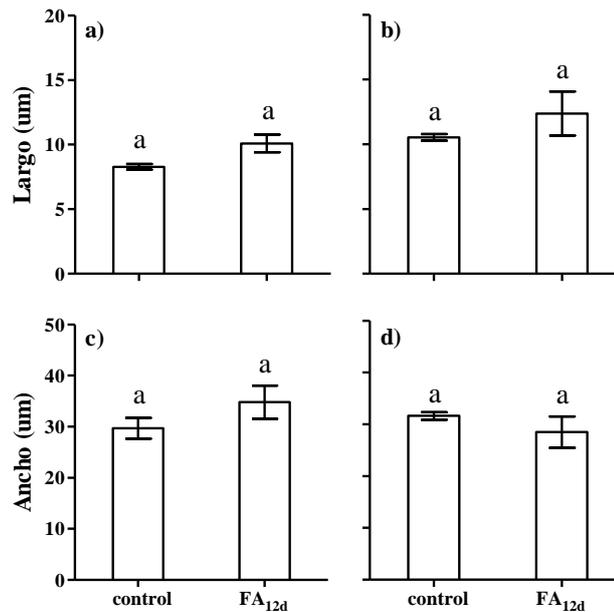
**Figura 2.11:** Cortes transversales de pericarpios de cipselas del control (Figura a) y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3), Figura b; A (desde primera antesis a fin de antesis), Figura c y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis), Figura d] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub>. Referencias: capa negra, CN; capa media, CM y capa interna comprimida, CIC.



**Figura 2.12:** Espesor del pericarpio (Figura a y b) y número de estratos de la capa media (Figura c y d) provenientes de cipselas del control y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp<sub>1</sub> y en A (desde primera antesis a fin de antesis), FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y en el control (sin sombreado) en el Exp<sub>1,2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub> (Figura a y c) y del Exp<sub>2</sub> (Figura b y d). Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para cada experimento.



**Figura 2.13:** Cortes transversales de membrana seminal de las cipselas del control (Figura a y c) y del tratamiento de sombreado realizado en FA<sub>12d</sub> (i.e. durante 12 días a partir fin de antesis, Figura b y d) del Exp<sub>1</sub> (Figura a y b) y del Exp<sub>2</sub> (Figura c y d). Referencias: cutícula gruesa (flecha), pared celular (pc) y citoplasma (ct).

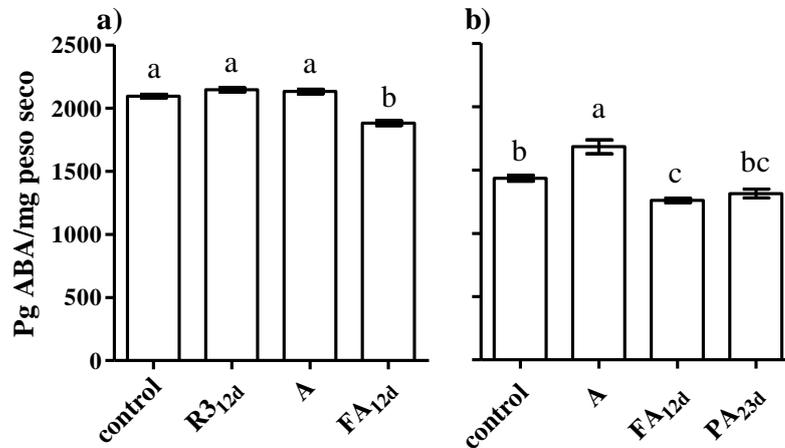


**Figura 2.14:** Largo (Figura a y b) y ancho (Figura c y d) de las células que componen la membrana seminal de cipselas provenientes del control y de los tratamientos de sombreo realizados en FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) del Exp<sub>1</sub> (Figura a y c) y de Exp<sub>2</sub> (Figura b y d). Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras similares sobre las barras indican que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para cada experimento.

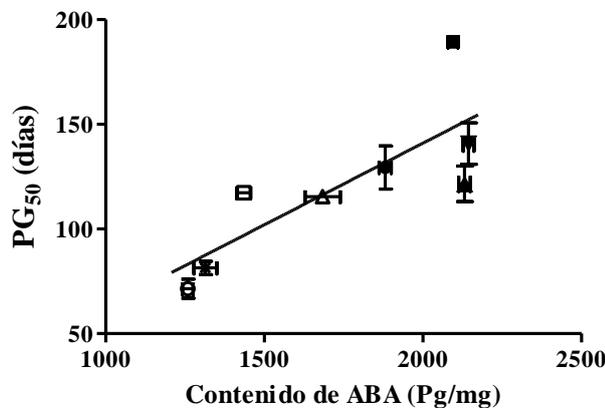
### 2.3.1.6 Control hormonal de la dormición: Contenido de ABA endógeno a cosecha

La medición del contenido de ABA endógeno en el control y en los tratamientos de sombreo de los Exp<sub>1-2</sub> y la posterior realización de análisis de variancia (uno por cada experimento) mostró que el contenido de ABA varió en función del momento en el que se produjo el sombreo (Figura 2.15). En el Exp<sub>1</sub>, cuando el sombreo se produjo en las primeras etapas de desarrollo y crecimiento del pericarpio (R3<sub>12d</sub> y A), el contenido de ABA fue similar al control (Figura 2.15 a). Sin embargo, cuando el sombreo se produjo en etapas más avanzadas (FA<sub>12d</sub>) el contenido de ABA se redujo en forma significativa (Figura 2.15 a). En contraposición, en el Exp<sub>2</sub>, el contenido de ABA en el tratamiento realizado durante antesis (A) fue significativamente más alto que el control (Figura 2.15 b). Mientras que, el contenido de ABA endógeno en el tratamiento de sombreo realizado durante FA<sub>12d</sub>, y en forma similar a lo que sucedió en el Exp<sub>1</sub>, fue significativamente inferior al correspondiente al control (Figura 2.15 b). Finalmente, el contenido de ABA endógeno en el tratamiento PA<sub>23d</sub> fue intermedio a los valores medidos en las semillas del tratamiento FA<sub>12d</sub> y el control (Figura 2.15 b). El contenido de ABA endógeno también varió entre experimentos. Nótese que el contenido de ABA endógeno promedio de todos los tratamientos fue de  $2063 \pm 45$  y de  $1422 \pm 39$  pg ABA/mg peso seco en el Exp<sub>1</sub> y Exp<sub>2</sub> respectivamente. La regresión significativa y

positiva entre el  $PG_{50}$  y el contenido de ABA de ambos experimentos sugiere que el contenido de ABA podría estar explicando, al menos en parte ( $R^2=0.63$ ), las diferencias en el  $PG_{50}$  entre tratamientos de sombreado (Figura 2.16).



**Figura 2.15:** Contenido endógeno de ABA de semillas de girasol provenientes del control y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3) en el Exp<sub>1</sub>, en A (desde primera antesis a fin de antesis), FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y en el control (sin sombreado) en el Exp<sub>1-2</sub> y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis) en el Exp<sub>2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en el Exp<sub>1</sub> (Figura a) y en el Exp<sub>2</sub> (Figura b). Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para cada experimento.

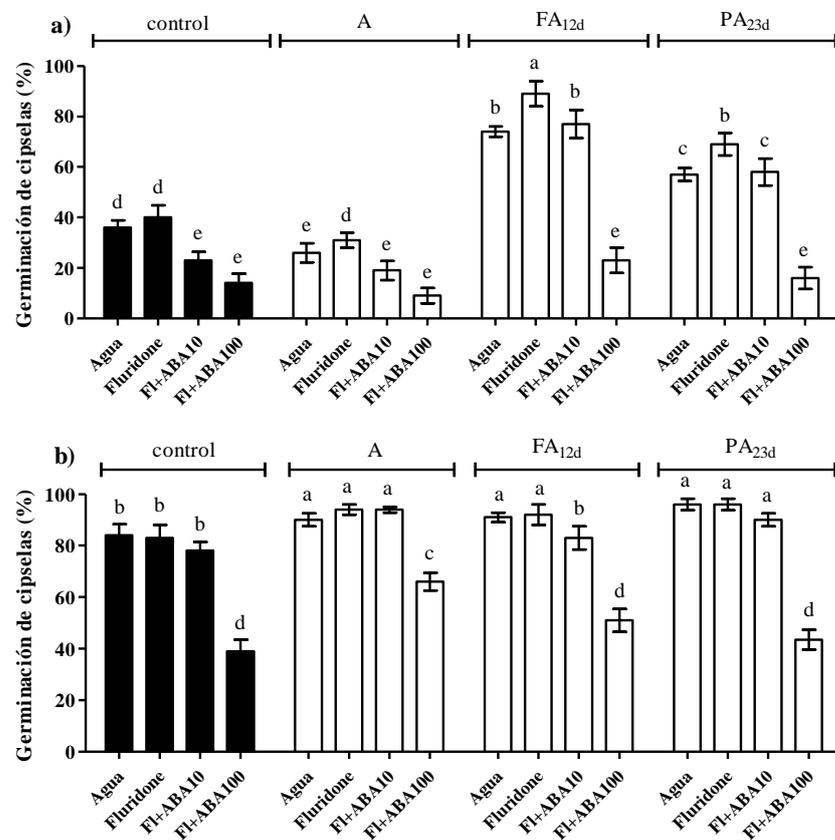


**Figura 2.16:** Relación entre el número de días necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% ( $PG_{50}$ ) y el contenido endógeno de ABA de semillas de girasol provenientes del control (cuadrado) y de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes estados [R3<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir de R3, triángulo invertido) en el Exp<sub>1</sub>, A (desde primera antesis a fin de antesis, triángulo) y FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis, círculo) en los Exp<sub>1-2</sub>, y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis, círculo estrellado) en el Exp<sub>2</sub>] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>1</sub> (símbolos llenos) y del Exp<sub>2</sub> (símbolos vacíos). Las barras verticales y horizontales sobre los símbolos son  $\pm$  un error del estándar de la media. Línea de regresión:  $y = -15,02 + 0,08X$ ,  $R^2 = 0,63$ ,  $p = 0,001$ ,  $n = 28$ .

### 2.3.1.7 Control hormonal de la dormición: Sensibilidad al ABA

La evaluación de la sensibilidad al ABA en las cipselas del control y en los tratamientos de sombreado realizados en distintos estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio del Exp<sub>2</sub> a los 96 y 141 días después de la cosecha, sugiere que una menor

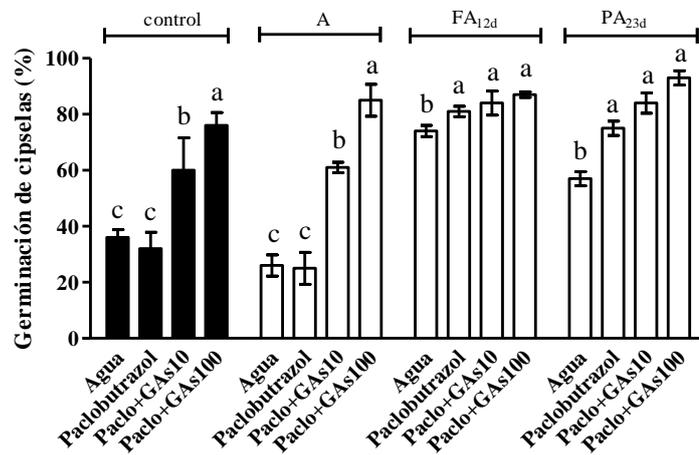
oferta de radiación durante el período de desarrollo y crecimiento del pericarpio no afectaría la sensibilidad al ABA de los frutos (Figura 2.17). El hecho de que la incubación de las cipselas, a los 96 días después de la cosecha, en un medio con Fluridone (i.e. inhibidor de la síntesis *de novo* de ABA) no eliminara las diferencias en el PG de las cipselas incubados en agua impidió realizar algún tipo de inferencia sobre la sensibilidad al ABA de los distintos tratamientos de sombreado (Figura 2.17 a). Debido a ello, se realizó un segundo experimento a los 141 días después de la cosecha, cuando el PG de las cipselas incubadas en agua del control y de los tratamientos de sombreado fueron  $\geq 90\%$ . Todos los tratamientos respondieron de manera similar ante el aumento de concentraciones exógenas de ABA al medio de incubación (Figura 2.17 b).



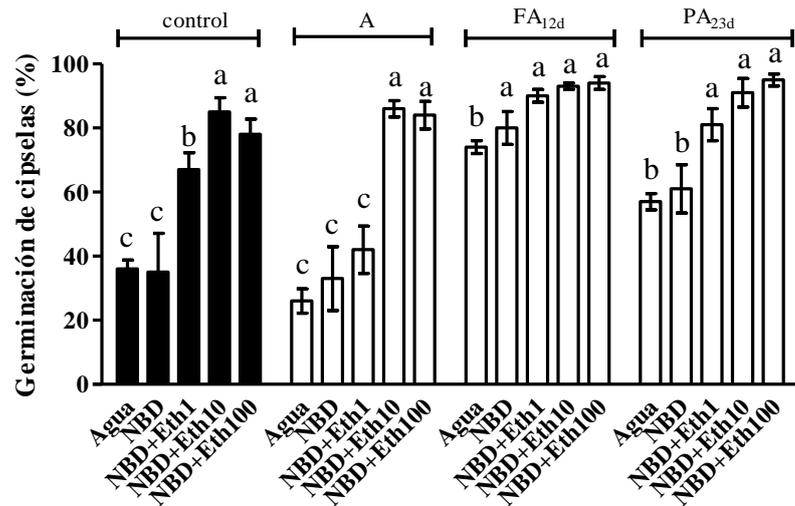
**Figura 2.17:** Porcentaje de germinación de cipselas de girasol incubadas a 25°C a los 96 (Figura a) y 141 (Figura b) días desde la cosecha provenientes del control (barras negras) y de los tratamientos de sombreado [A (desde primera antesis a fin de antesis), FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis), barras blancas] del Exp<sub>2</sub> en diferentes medio de incubación: en Agua, Fluridone 100μM, Fluridone 100μM + ABA 10μM (Fl+ABA10) y Fluridone 100μM + ABA 100μM (Fl+ABA100). Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos y medio de incubación.

### 2.3.1.8 Control hormonal de la dormición: Sensibilidad a las GAs y al Etileno.

La falta de variación en el porcentaje de germinación ante el agregado de Paclobutrazol (i.e. inhibidor de la síntesis *de novo* de GAs; Figura 2.18) y NBD (i.e. inhibidor competitivo de la acción de Etileno; Figura 2.19) al medio de incubación sugiere que la síntesis *de novo* de ambas hormonas no estarían implicadas en la liberación de la dormición. Sin embargo, el aumento significativo del PG de los tratamientos (i.e. control y A), cuando se incubaron en un medio con GAs (Figura 2.18) y Ethepon (Figura 2.19) muestra que estas hormonas estimulan la germinación. A su vez, no se observó un patrón claro de diferencias en la respuesta al agregado de dosis creciente de estas hormonas entre tratamientos, lo que no permite definir si existe una sensibilidad diferencial a las mismas producto de los tratamientos ensayados; esto estuvo en parte determinado por los altos valores de germinación observados en agua para algunos de los tratamientos de sombrero.



**Figura 2.18:** Porcentaje de germinación de cipselas de girasol incubadas a 25°C a los 96 días desde la cosecha provenientes del control (barras negras) y de los tratamientos de sombrero impuestos en diferentes estados [A (desde primera antesis a fin de antesis), FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis); barras blancas] del Exp<sub>2</sub> en diferentes medio de incubación: en agua, Paclobutrazol 100μM, Paclobutrazol 100μM + GAs 10μM (Paclo+GAs10), Paclobutrazol 100μM + GAs 100μM (Paclo+GAs100). Las líneas verticales sobre las barras indican ± un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05) entre tratamientos y medio de incubación.



**Figura 2.19:** Porcentaje de germinación de cipselas de girasol incubadas a 25°C a los 96 días desde la cosecha provenientes del control (barras negras) y de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes ventana de tiempo [A (desde primera antesis a fin de antesis), FA<sub>12d</sub> (durante 12 días a partir fin de antesis) y PA<sub>23d</sub> (durante 23 días a partir de primera antesis, barras blancas)] del Exp<sub>2</sub>, en diferentes medio de incubación: en Agua, NBD (2, 5-norbornadiene) 100μM, NBD 100μM + Ethephon 10μM (NBD + Eth10), NBD 100μM + Ethephon 100μM (NBD + Eth100). Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos y medio de incubación.

### 2.3.2 Efecto del sombreo sobre el cultivo y el canopeo sobre el nivel de dormición de los frutos

#### 2.3.2.1 Condiciones de crecimiento

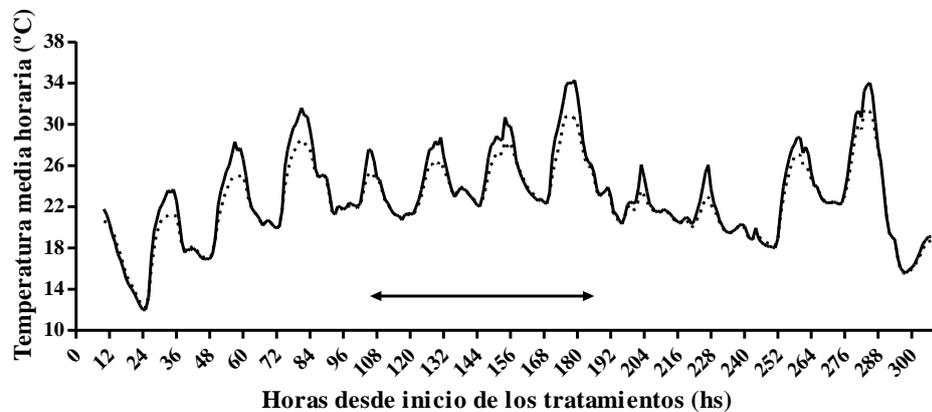
En la Tabla 2.5 se detallan las condiciones climáticas registradas durante la realización del Exp<sub>3</sub>. La duración de la etapa de siembra-antesis (S-An) y de antesis-madurez fisiológica (An-MF) fue de 75 y 39 días para cada etapa respectivamente. La temperatura media fue levemente mayor en la etapa S-An (i.e. 24.4°C) que en la etapa de An-MF (i.e. 23°C). Mientras que, la radiación incidente disminuyó un 17% durante la etapa de An-MF comparada con la S-An.

**Tabla 2.5:** Datos meteorológicos promedio y duración de las fases de Siembra-Antesis (S-An) y Antesis-Madurez Fisiológica (An-MF) del experimento de sombreo (Exp<sub>3</sub>). Fotoperíodo (Fotop, hs), temperatura máxima media (Tmáx., °C), temperatura mínima media (Tmín., °C) y radiación incidente diaria (RI, MJ m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup>). Datos de la Estación Meteorológica EMA Ortúzar, ubicada a 600 metros del experimento.

Fases de desarrollo del cultivo	Fotop. (hs)	Tmáx (°C)	Tmín (°C)	RI (MJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )
S a An (75 días)	15.2 $\pm$ 0.2	29.6 $\pm$ 3.6	19.2 $\pm$ 3.2	23.4 $\pm$ 5.3
An a MF (39 días)	13.9 $\pm$ 0.4	27.8 $\pm$ 3.4	17.8 $\pm$ 3.7	19.4 $\pm$ 4.7

### 2.3.2.2 Caracterización del ambiente durante la imposición de los tratamientos de sombreado

La dinámica de la temperatura media horaria del canopeo en el control y en los tratamientos de sombreado realizados en todo el cultivo ( $SOMB_{CUL}$ ) y en el canopeo ( $SOMB_{CAN}$ ) fueron similares, excepto durante las horas cercanas a mediodía (Figura 2.20). La temperatura media horaria fue más baja (de 1 a 3°C) durante las 10 y las 14 horas en  $SOMB_{CUL}$  y  $SOMB_{CAN}$  comparado con el control. A pesar de ello, la temperatura media, máxima, mínima diaria y la temperatura media diaria de 10 a 14 horas del canopeo no difirieron significativamente entre  $SOMB_{CUL}$ ,  $SOMB_{CAN}$  y el control durante el período de aplicación de los tratamientos de sombreado (Tabla 2.6).

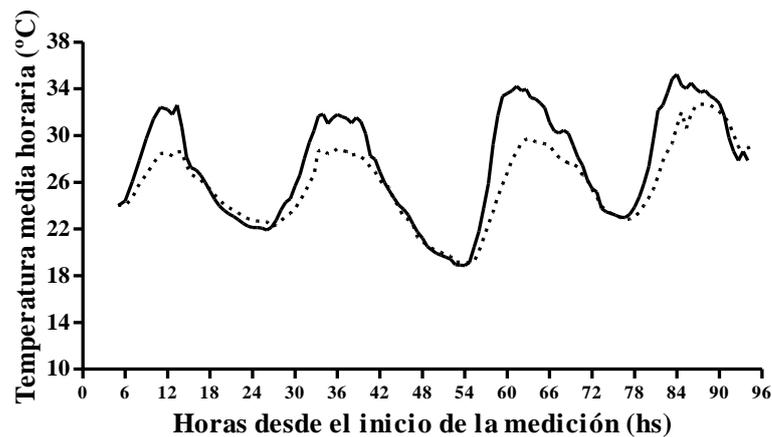


**Figura 2.20:** Temperatura media horaria del canopeo del control (sin sombreado, línea negra continua) y de los tratamientos de sombreado del cultivo ( $SOMB_{CUL}$ ) y del canopeo ( $SOMB_{CAN}$ ) durante 12 días después de fin de antesis (línea punteada negra) del Exp<sub>3</sub>. La dinámica de la temperatura media horaria de los dos tratamientos de sombreado se simbolizan con una única línea debido a que no se registraron diferencias entre ambas. La flecha horizontal sobre el eje x indica la ventana de tiempo en la que se midió la temperatura de las cipselas (i.e. desde el cuarto al octavo día de tratamiento).

**Tabla 2.6:** Temperatura media, máxima media y mínima media diaria y temperatura media diaria de 10 a 14 horas (°C) del control y de los tratamientos de sombreado del cultivo ( $SOMB_{CUL}$ ) y del canopeo ( $SOMB_{CAN}$ ) durante 12 días a partir de fin de antesis del Exp<sub>3</sub>. Las medias seguidas por letras similares indican que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos para cada una de las variables evaluadas.

Temperatura del aire en el canopeo	Tratamiento		
	control	$SOMB_{CUL}$	$SOMB_{CAN}$
Temp. Media Diaria	23.4 ± 0.8 a	22.7 ± 0.7 a	22.2 ± 0.7 a
Temp. Máx. Diaria	30.1 ± 1.1 a	28.0 ± 0.9 a	28.1 ± 0.9 a
Temp. Mín. Diaria	17.5 ± 0.8 a	17.6 ± 0.8 a	17.0 ± 0.8 a
Temp. Media 10 a 14 hs	25.1 ± 1.1 a	24.0 ± 0.9 a	23.5 ± 1.0 a

Durante el período de tiempo en el que se midió la temperatura de las cipselas (i.e. desde el cuarto al octavo día durante la imposición de los tratamientos de sombreado), estas replicaron la marcha de la temperatura registrada en el canopeo (Figuras 2.20 y 2.21). Sin embargo, la temperatura media diaria de las cipselas fue mayor que la correspondiente al canopeo; acentuándose estas diferencias durante el mediodía. La temperatura media de las cipselas desde las 10 hasta las 14 horas, fue de 5 a 8°C más alta que la temperatura del canopeo (Tabla 2.7). El uso de las medias sombras, como era previsible, en el SOMB<sub>CUL</sub> también disminuyó la temperatura de los frutos comparado con los frutos del control-SOMB<sub>CAN</sub> (Figura 2.21). La temperatura media diaria, máxima diaria y la temperatura media de 10 a 14 horas de las cipselas del tratamiento SOMB<sub>CUL</sub> fue significativamente inferior a la temperatura de las cipselas del control - SOMB<sub>CAN</sub> ( $p < 0.001$ , Tabla 2.7).



**Figura 2.21:** Temperatura media horaria de las cipselas del control (sin sombreado, línea negra continua) y del tratamiento de sombreado del cultivo (SOMB<sub>CUL</sub>, línea negra punteada) desde el cuarto y al octavo día de tratamiento de sombreado del Exp<sub>3</sub>.

**Tabla 2.7:** Temperatura media, máxima y mínima diaria y temperatura media de 10 a 14 hs (°C) de las cipselas y del canopeo de los tratamientos de sombreado del canopeo (SOMB<sub>CAN</sub>) y del cultivo (SOMB<sub>CUL</sub>) desde el cuarto y el octavo día de tratamiento de sombreado del Exp<sub>3</sub>. Medias  $\pm$  un error estándar seguidas por letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. Los capítulos del control y del tratamiento SOMB<sub>CAN</sub> estuvieron expuestos a la radiación solar directa.

Temperatura / Tratamiento	Cipsela		Canopeo	
	control - SOMB <sub>CAN</sub>	SOMB <sub>CUL</sub>	control - SOMB <sub>CAN</sub>	SOMB <sub>CUL</sub>
Temp. Media Diaria	27.4 $\pm$ 0.3 a	25.9 $\pm$ 0.3 b	23.7 $\pm$ 0.9 a	22.8 $\pm$ 0.8 a
Temp. Máx. Diaria	33.7 $\pm$ 0.4 a	30.0 $\pm$ 0.4 b	32.7 $\pm$ 1.6 a	29.9 $\pm$ 1.4 a
Temp. Mín. Diaria	21.1 $\pm$ 0.4 a	21.3 $\pm$ 0.4 a	17.8 $\pm$ 1.4 a	17.9 $\pm$ 1.4 a
Temp. Media 10 a 14 hs	32.5 $\pm$ 0.3 a	28.6 $\pm$ 0.4 b	24.2 $\pm$ 2.1 a	23.0 $\pm$ 1.7 a

### 2.3.2.3 Dinámica del crecimiento y peso del fruto a madurez fisiológica

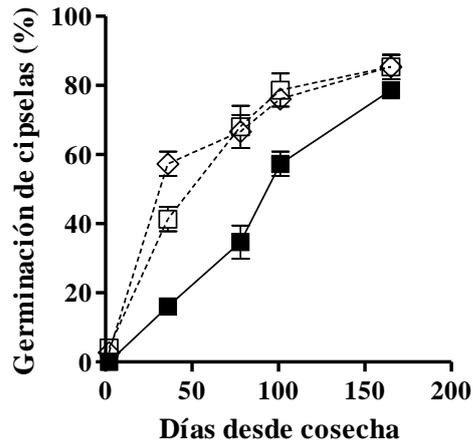
El peso promedio del fruto fue mayor en el control que en los dos tratamientos de sombreo. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos para esta variable ( $p > 0.05$ ). La duración del período de llenado de fruto fue similar entre tratamientos. En contraposición, la tasa de llenado del fruto en el control fue significativamente mayor que en los tratamientos de sombreo ( $p > 0.05$ , Tabla 2.8).

**Tabla 2.8:** Peso final y sus determinantes (i.e. tasa y duración del período de llenado de fruto) del control (sin sombreo) y de los tratamientos de sombreo del cultivo ( $SOMB_{CUL}$ ) y del canopeo ( $SOMB_{CAN}$ ) durante 12 días a partir fin de anthesis del  $Exp_3$ . Coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de la función de ajuste del peso de fruto en función de los días después de anthesis del control y de los tratamientos de sombreo. Medias  $\pm$  un error estándar seguidas por letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos.

Tratamientos	Tratamiento	Peso final del grano (mg)	Tasa de llenado (mg.día <sup>-1</sup> )	Duración del período de llenado (días)	R <sup>2</sup>
Exp <sub>3</sub>	control	36.1 $\pm$ 2.8 a	1.0 $\pm$ 0.1 a	33.0 $\pm$ 2.1 a	0.78
	$SOMB_{CUL}$	31.7 $\pm$ 2.2 a	0.7 $\pm$ 0.2 ab	35.0 $\pm$ 2.0 a	0.83
	$SOMB_{CAN}$	30.1 $\pm$ 5.8 a	0.6 $\pm$ 0.1 b	36.0 $\pm$ 1.5 a	0.86

### 2.3.2.4 Evolución del porcentaje de germinación en función de los días después de la cosecha

La evolución del porcentaje de germinación y el análisis de varianza del número de días necesarios para alcanzar el  $PG_{50}$  de cipselas incubadas a 25°C provenientes del control y de los tratamientos de  $SOMB_{CUL}$  y  $SOMB_{CAN}$  puso en evidencia que el sombreo de todo el cultivo ( $SOMB_{CUL}$ ) o del canopeo ( $SOMB_{CAN}$ ) afectó en forma similar la dormición de los frutos de girasol. A partir del día 40 y hasta los 100 días después de la cosecha el  $PG$  de  $SOMB_{CUL}$  y  $SOMB_{CAN}$  fueron similares y significativamente mayores que los  $PG$  del control (Figura 2.22). Coincidentemente, el  $PG_{50}$  de los tratamientos de  $SOMB_{CUL}$  y  $SOMB_{CAN}$  fueron similares ( $p > 0.05$ ) y significativamente menores que el  $PG_{50}$  del control (Tabla 2.9).



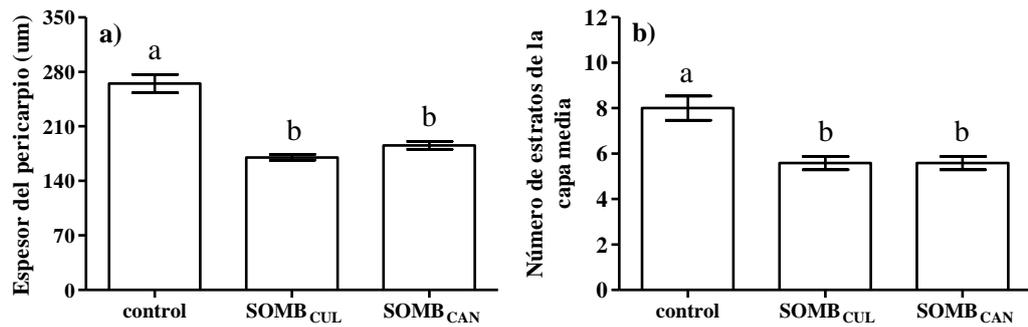
**Figura 2.22:** Evolución del porcentaje de germinación de cipselas incubadas a 25°C en función de los días después de la cosecha del control (sin sombreado, cuadrados llenos) y de los tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB<sub>CUL</sub>) y del canopeo (SOMB<sub>CAN</sub>) durante 12 días a partir fin de antesis del Exp<sub>3</sub>. El porcentaje de germinación de las cipselas se evaluó hasta que esta variable alcanzó un valor  $\geq 80\%$ . Las líneas verticales sobre los símbolos indican  $\pm$  un error estándar de la media y solamente se muestran cuando su valor excede el tamaño de los símbolos.

**Tabla 2.9:** Funciones ajustadas a la relación entre el porcentaje de germinación (PG) y los días después de la cosecha (ddc); y el número de días después de la cosecha necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG<sub>50</sub>, estimada con la función de ajuste entre el PG/ddc) del control (sin sombreado) y de los tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB<sub>CUL</sub>) y del canopeo (SOMB<sub>CAN</sub>) durante 12 días a partir fin de antesis de cipselas incubadas a 25°C del Exp<sub>3</sub>. A la derecha de las funciones ajustadas se detalla el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) y el número de datos usado en cada función de ajuste. Las medias del PG<sub>50</sub> seguidas por letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos.

Tratamiento	Función ajustada, $R^2$ y n	PG <sub>50</sub> (días)
control	$PG_{50} = -0.7 + 0.5/x$ ; $R^2: 0.95$ ; $n=15$	$102.2 \pm 11.3$ a
SOMB <sub>CAN</sub>	$PG_{50} = 7.5 + (-0.3) \times 0.5$ ; $R^2: 0.93$ ; $n=15$	$48.4 \pm 20.1$ b
SOMB <sub>CUL</sub>	$PG_{50} = 7.2 + 1.5 \times 0.5$ ; $R^2: 0.94$ ; $n=15$	$46.3 \pm 15.7$ b

### 2.3.2.5 Espesor de las cubiertas seminales

El espesor del pericarpio de los tratamientos de SOMB<sub>CUL</sub> y SOMB<sub>CAN</sub> fue similar pero significativamente menor que el espesor del pericarpio del control (Figura 2.23 a). Las diferencias en el espesor del pericarpio se asociaron con el número de estratos de la capa media. El número de estratos de la capa media del pericarpio fue significativamente mayor en el control que en los tratamientos de SOMB<sub>CUL</sub> y SOMB<sub>CAN</sub> (Figura 2.23 b).



**Figura 2.23:** Espesor del pericarpio (Figura a) y número de estratos de la capa media (Figura b) de pericarpios provenientes de cipselas del control (sin sombreado) y de los tratamientos de sombreado del cultivo (SOMB<sub>CUL</sub>) y del canopeo (SOMB<sub>CAN</sub>) durante 12 días a partir fin de antesis del Exp<sub>3</sub>. Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos.

## 2.4 DISCUSIÓN

El análisis conjunto de los resultados de los dos experimentos de sombreado realizados en diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio (i.e. desde la etapa final de división celular de las paredes del ovario hasta que el pericarpio alcanza su máximo peso seco) sirvieron para demostrar, por primera vez, que la radiación incidente afectó la dinámica de la salida de la dormición de los frutos de girasol del genotipo evaluado. El sombreado aumentó la tasa de salida de la dormición durante la post-cosecha (Figura 2.7 b y Tabla 2.4) pero, no afectó de manera significativa el nivel de dormición de los frutos al mes de la cosecha, ya que éstos presentaron bajos niveles de germinación (el PG fue inferior al 20% en todos los tratamientos, barras negras en Figuras 2.9 y 2.10). Estos resultados permiten inferir que, en condiciones de cultivo, una reducción en la cantidad de radiación incidente (i.e. fechas de siembra de tardías y/o años con alta nubosidad) durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio podrían afectar la tasa de salida de la dormición de los frutos de girasol durante el almacenaje. Sin embargo, los efectos del sombreado sobre el nivel de dormición descritos en este capítulo han sido substancialmente menores a los hallados por Bodrone *et al.*, (2017) variando la fecha de siembra del cultivo. Los frutos provenientes de los cultivos de fechas de siembra más tempranas exhibieron un 95% de dormición a cosecha, mientras que los frutos de las fechas de siembra más tardías presentaron un 50% de dormición a cosecha. En suma a lo anterior, la cantidad de días desde la cosecha (ddc) que transcurrieron hasta alcanzar un nivel óptimo de germinación (i.e.  $\approx 90\%$ ) vario desde 75 ddc para la fecha de siembra normal a 30 ddc para la fecha de siembra tardía. Las

diferencias entre los resultados de ambos experimentos probablemente tengan su origen en tres causas de distinto orden: i) se tratan de genotipos diferentes; ii) por efectos aditivos ó sinérgicos de los factores del ambiente que varían en forma simultánea ante cambios en la fecha de siembra y iii) la forma en cómo varia la radiación durante el período de llenado no es la misma en ambos experimentos. En los experimentos de fechas de siembra la cantidad de radiación incidente disminuye en forma gradual durante todo el período de desarrollo y crecimiento del grano. Mientras que, en los experimentos presentados en este capítulo, la reducción del nivel de radiación incidente se produjo en forma abrupta y constante durante un breve período de tiempo durante el crecimiento y desarrollo del fruto.

La realización de un tercer experimento sirvió, para documentar que una reducción en el nivel de radiación incidente (i.e. durante 12 días después de fin de anthesis) aumentó la velocidad de salida de la dormición debido probablemente a una limitación de la fuente y no a la actividad de los destinos (Figura 2.22). La dinámica de salida de la dormición de los frutos procedentes de cultivos en los que se sombreó sólo el canopeo, fue similar a la de los frutos provenientes de los cultivos en los que se sombreo todo el cultivo, y mayor que la correspondiente a los cultivos que no fueron sombreados (Tabla 2.9). En este mismo sentido, Saranga *et al.* (1998) demostraron, mediante la aplicación de diferentes niveles de defoliación, que los frutos de girasol provenientes de plantas con una alta relación fuente/destino eran más pesados, pero con un menor porcentaje de germinación que los frutos provenientes de plantas con una baja relación fuente/destino. Asimismo, estos autores sugieren fuertemente que la dormición de los frutos de girasol no solo depende de la oferta de recursos del ambiente, durante la formación de las estructuras de la cipsela, sino también del tamaño y funcionalidad de la fuente (i.e. duración del área foliar en post-anthesis). La que no solo es afectada por los factores abióticos (i.e. radiación, agua, nutrientes) sino también por los factores bióticos (i.e. plagas y enfermedades) y el manejo del cultivo (i.e. fechas de siembra, densidades, aplicación de fungicidas, desecantes). La caída del porcentaje de dormición, documentada por Bodrone *et al.* (2017), debido a un atraso en la fecha de siembra, podría estar asociada, no solo a una menor oferta de los recursos (i.e. temperatura y radiación) del ambiente, sino también a los efectos del ambiente sobre la duración el área foliar en post-anthesis. En este sentido, de la Vega y Hall (2002) demostraron que un atraso en la fecha de siembra en girasol reduce la duración del área foliar en post-anthesis

y como consecuencia de ello la cantidad de radiación interceptada acumulada durante esta etapa. En los experimentos, de la Vega y Hall (2002) la radiación interceptada acumulada durante esta etapa en las fechas de siembra tardías disminuyó un 40% en comparación con las fechas de siembra tempranas debido a una caída en la radiación incidente (aprox. un 16%) y a una menor duración del área foliar en post-antesis.

La dinámica similar de la salida de la dormición de los tratamientos de sombreado realizados en diferentes etapas de desarrollo y crecimiento del pericarpio de ambos experimentos (Figura 2.7) mostró que no existe un período de mayor sensibilidad de la dormición al sombreado, al menos durante la ventana de tiempo evaluada en esta tesis (la única excepción fue el tratamiento de sombreado realizado durante la antesis del Exp<sub>2</sub>, Tabla 2.4). La escasa variación de la temperatura media diaria y de la radiación incidente diaria entre los tratamientos de sombreado realizados en diferentes ventanas de tiempo en ambos experimentos consolidó esta aseveración (Figura 2.5). Durante la ventana de tiempo en la que se realizaron los distintos tratamientos de sombreado, una menor cantidad de radiación incidente reduce en proporciones variables el número de frutos llenos (Chimenti y Hall, 2001; Cantagallo *et al.*, 2004; Lindström *et al.*, 2006). En este contexto, y teniendo en cuenta que la actividad de la fuente podría afectar la dormición (Figura 2.22 y Tabla 2.9), es probable que el sombreado haya afectado el número de frutos llenos en proporciones variables en los distintos tratamientos de realizados en los Exp<sub>1-2</sub> de este capítulo; de forma tal que la relación destino/fuente haya sido similar entre los distintos tratamientos de sombreado y que como consecuencia de ello no se hayan producido diferencias en la dormición entre los tratamientos de sombreado. En adición a lo anterior, una mayor removilización de fotoasimilados acumulados en el tallo y capítulo hacia el fruto (i.e. 20-27%; Hall *et al.*, 1989) y 65% (Adrianasolo *et al.*, 2017) pudo también haber contribuido a este resultado. Nótese que el peso del grano fue similar en los distintos tratamientos de sombreado (Tabla 2.8).

La temperatura que explora el cultivo durante el desarrollo y crecimiento de los frutos es un factor clave en la regulación del nivel de dormición (Fenner, 1991; Benech-Arnold, 2004 y Allen *et al.*, 2007). En el girasol, se sabe que una mayor temperatura (31°C vs 24°C) durante el período de llenado de grano aumenta el nivel de dormición de sus frutos (Fonseca y Sánchez; 2000). El uso de las medias sombras, que se utilizaron en los experimentos descriptos en este capítulo para imponer los tratamientos de

sombreo, puede generar una reducción de la temperatura a la que están expuestas las plantas debajo de estas estructuras (Izquierdo *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2012; y Mayer, 2015) y como consecuencia de ello sobreestimar el efecto del sombreado sobre la salida de la dormición. Estas diferencias pueden ser aún mayores en los frutos de los capítulos de girasol que permanecen en posición vertical (Ploschuk y Hall 1995), como lo son los capítulos del cultivar utilizado en los experimentos presentados en este capítulo. Sin embargo, y a pesar de las diferencias de temperatura registradas en las cipselas de los capítulos sombreados y los expuestos a la radiación natural del Exp<sub>3</sub> (i.e.  $\approx 4^{\circ}\text{C}$  de 10 a 14 hs; Figura 2.20 y Tabla 2.7), la similar evolución del PG de ambos tratamientos (Figura 2.22) puso de manifiesto que el ambiente térmico de los frutos debajo de las carpas en los experimentos en los que se sombreadon los cultivos en diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio (Exp<sub>1-2</sub>) no habría afectado la respuesta a la dormición. Por otra parte, el descenso de la temperatura del canopeo debido al uso de las medias sombras también puede afectar la fotosíntesis del cultivo y ocasionar una sobreestimación de los efectos del sombreado sobre la dormición de los frutos. Sin embargo, y a pesar de que la temperatura fue más baja ( $1-3^{\circ}\text{C}$ ) desde las 10 a las 14 horas en el canopeo de los tratamientos de sombreado (Tablas 2.2 y 2.6), la temperatura media durante este rango horario en todos los tratamientos de sombreado, estuvo dentro del rango térmico a la cual la fotosíntesis de un canopeo de girasol es máxima (i.e.  $25-40^{\circ}\text{C}$ ; Hernández y Orioli, 1994).

Los resultados presentados en este capítulo demostraron claramente que, una merma en la cantidad de radiación incidente durante el período de desarrollo y crecimiento del pericarpio modificó la dinámica de salida de la dormición de los frutos debido a cambios en la dormición impuesta por las cubiertas del fruto y, en mucha menor medida debido a cambios en la dormición embrionaria. La extensa duración del período de dormición de los frutos (entre 180 y 90 días para lograr un PG<sub>50</sub>, Tabla 2.4), el alto porcentaje de germinación de los embriones a los 30 días después de la cosecha (Figuras 2.9 y 2.10 para el Exp<sub>1</sub> y Exp<sub>2</sub> respectivamente) y el hecho de que las diferencias en la dinámica de la salida de la dormición entre el control y los tratamientos de sombreado se hayan expresado cuando los frutos se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$  (Figura 2.7 a) y no a  $12^{\circ}\text{C}$  (Figura 2.8) en el Exp<sub>1</sub> confirman esta aseveración. Estos resultados son consistentes con los hallados por Corbineau *et al.* (1988 & 1990), Benech-Arnold (2004) y Bodrone *et al.* (2017). Coincidentemente, el aumento de la dormición debido a

las altas temperaturas durante el período de llenado del fruto en el cultivo de girasol se asoció con un incremento de la dormición impuesta por las cubiertas seminales y un remanente de dormición embrionaria (Rodríguez *et al.*, 2003 y Bodrone *et al.*, 2017).

La realización y el estudio de los cortes histológicos del pericarpio de los frutos a madurez de cosecha sugieren, que el espesor del pericarpio podría estar explicando, al menos en parte, los cambios en la dormición impuesta por las cubiertas de los frutos debido a una reducción en la cantidad de radiación incidente durante la formación de estas estructuras. Coincidentemente, el pericarpio de los frutos de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes ventanas de tiempo, fueron más delgados y tuvieron un  $PG_{50}$  menor que el control en ambos experimentos (Figuras 2.11 y 2.12). En adición a lo anterior, no se registraron diferencias en el  $PG_{50}$  ni tampoco en el espesor del pericarpio entre los tratamientos de sombreo realizados en diferentes ventanas de tiempo (Figura 2.7 a y b). En contraposición, a lo descrito para el pericarpio, el efecto de la radiación incidente no afectó la estructura celular (i.e. ancho y largo) de la membrana seminal (Figuras 2.13 y 2.14). Coincidentemente, en la bibliografía hay una gran cantidad de trabajos que muestran la asociación entre el espesor de las cubiertas seminales y el nivel de dormición (Brainard *et al.* 2005, Gallagher *et al.* 2013, Andrade *et al.* 2015). Sin embargo, este tipo de asociaciones desconocen que los factores del ambiente no solo modifican el espesor del pericarpio, sino también la deposición de ciertos compuestos químicos [e.g. compuestos fenólicos: Dorne (1981), Roach y Wulf (1987), Presotto *et al.* (2014) y Ceccato *et al.* (2015)]. Los cambios en la composición química de las paredes del pericarpio y de la membrana seminal podrían afectar la funcionalidad de estas membranas (i.e. difusión del agua y/ del oxígeno), alterando así las condiciones internas del embrión (Hu *et al.*, 2012 y Penfield y MacGregor, 2017).

La asociación significativa y positiva entre el  $PG_{50}$  y el contenido endógeno de ABA de los controles y tratamientos de sombreo de ambos experimentos (Figura 2.16) sugiere que el contenido de ABA endógeno estaría involucrado en las diferencias en dormición ocasionadas por efecto de la radiación (Riveira Rubin *et al.*, 2018). El hecho de que el 48% de la variancia total no error del  $PG_{50}$  no es explicada por esta variable sugiere que una diferente sensibilidad al ABA u otras hormonas (i.e. GAs y Etileno) también podrían estar jugando un rol en el efecto que produjo el sombreo sobre el  $PG_{50}$ . Sin embargo, los resultados obtenidos evidenciaron que la sensibilidad al ABA sería

similar en los frutos provenientes de los distintos tratamientos de sombreo (Figura 2.17). Por otra parte, la ausencia de patrones significativos de variación en la respuesta germinativa entre tratamientos al agregado de inhibidores de la síntesis de las GAs y de Etileno y dosis crecientes de ambas hormonas, mostró que estas dos hormonas tampoco explicarían las diferencias en el  $PG_{50}$  de los distintos tratamientos de sombreo. En el caso de la sensibilidad al ABA, y antes de descartar su posible rol en las diferencias en el nivel de dormición como resultado de los tratamientos de sombreo, es necesario evaluarla no solo en cipselas, como se hizo en esta tesis, sino también en embriones. La capacidad de respuesta al ABA del embrión aislado puede no reflejar su comportamiento dentro de la cipsela intacta. Las cubiertas del fruto pueden afectar la respuesta al ABA, en particular a bajas temperaturas de incubación (Bodrone *et al.*, 2017). Un tercer aspecto del ABA que podría explicar la variancia residual de la relación entre el  $PG_{50}$ /ABA endógeno es la síntesis de ABA *de novo* durante la incubación de los frutos. La síntesis de ABA *de novo* puede estar asociada en girasol al mantenimiento de la dormición de los frutos luego de la cosecha. La importancia de la síntesis de ABA *de novo* fue descrita inicialmente en ejes embrionarios de girasol provenientes de embriones inmaduros con altos niveles de dormición, donde la aplicación al medio de Fluridone promovió la germinación (Corbineau y Côme, 1987; Le Page-Degivry *et al.*, 1990). En este mismo sentido, Bodrone *et al.* (2017) aumentaron el porcentaje de germinación de frutos de girasol con un alto nivel de dormición a cosecha mediante la aplicación de un inhibidor de la síntesis de ABA (Fluridone).

## **CAPÍTULO 3:**

### **EFFECTO DEL FOTOPERÍODO SOBRE EL NIVEL DE DORMICIÓN DE FRUTOS DE GIRASOL**

### 3.1 INTRODUCCIÓN

Recientemente, Bodrone *et al.* (2017) demostraron que la dormición disminuye a medida que la fecha de siembra de los cultivos de girasol se retrasa (fechas de septiembre vs noviembre, en Pergamino). En el capítulo 2 de esta tesis se demostró que además de la temperatura (Bodrone *et al.*; 2017), la radiación incidente afecta la dormición en frutos de girasol. Sin embargo, un retraso en la fecha de siembra no solo reduce la cantidad de radiación incidente y la temperatura durante el período de llenado de grano, sino también, la duración del día.

El efecto del fotoperíodo sobre el nivel de dormición se ha documentado en numerosas especies espontáneas y cultivadas (Fenner, 1991; Gutterman, 2000; Contreras *et al.*, 2008). En algunas especies, los fotoperíodos cortos y bajas temperaturas durante el desarrollo y crecimiento de los frutos disminuyen la dormición de las semillas (Fenner, 1991). Así por ejemplo, en fechas de siembra tardías (bajas temperaturas y fotoperíodos cortos) las semillas de *Chenopodium quinoa* presentan un menor nivel de dormición impuesto por las cubiertas y un aumento de la dormición embrionaria en comparación con semillas cultivadas en fechas de siembra tempranas (Ceccato *et al.*, 2011). Si bien hasta el presente no hay información acerca del efecto del fotoperíodo sobre la dormición de los frutos de girasol, la información disponible en esta especie, para otros factores del ambiente, sugiere que los cambios en el nivel de dormición debido al fotoperíodo podrían también estar asociados con un cambio en la dormición impuesta por las cubiertas. La temperatura (i.e. altas temperaturas, Bodrone *et al.*, 2017) y la cantidad de radiación incidente (i.e. bajos niveles de radiación, Figura 2.7, Capítulo 2 de esta tesis) durante el período de desarrollo y crecimiento del pericarpio afectan el nivel de dormición de los frutos de girasol debido, principalmente, a cambios en la dormición impuesta por las cubiertas del fruto. Si bien existen excepciones, los días largos en numerosas especies promueven cubiertas más gruesas y duras, que aumentan el nivel de dormición (Gutterman, 1973; Gutterman, 1974; Heide *et al.*, 1976; Kigel *et al.*, 1979). En este sentido, los experimentos descritos en el capítulo 2 de esta tesis mostraron que una caída de la radiación incidente durante el período desarrollo y crecimiento del pericarpio en el girasol disminuye el espesor del pericarpio y el número de días necesarios para alcanzar el PG<sub>50</sub>. De confirmarse que el

fotoperíodo afecta la dormición impuesta por las cubiertas ésta podría estar asociada también, con cambios en el espesor de las cubiertas seminales.

El ABA es quizás la principal hormona en las respuestas de las plantas al estrés abiótico y además aumenta durante la maduración de la semilla (He *et al.*, 2014). El ABA es un regulador positivo tanto de la inducción como del mantenimiento de la dormición (Bewley, 1997; Benech-Arnold, 2004). Contreras *et al.* (2008) demostraron que las semillas de *Lactuca sativa* L. provenientes de cultivos que crecieron bajo fotoperíodos cortos (8 horas) presentaban un menor nivel de dormición a madurez en comparación a las provenientes de fotoperíodos largos (16 horas) debido a un menor contenido de ABA endógeno y a una menor sensibilidad al ABA. En el cultivo de girasol, la evidencia disponible indica que la asociación entre el ABA y el nivel de dormición varía de acuerdo al factor del ambiente considerado. El mayor nivel de dormición, debido a las altas temperaturas durante el período de llenado de grano, se asoció con un aumento en la sensibilidad al ABA (Bodrone *et al.*, 2017). En contraposición, no se encontró una asociación similar cuando los cambios en el nivel de dormición se produjeron debido a una menor cantidad de radiación incidente durante el crecimiento y desarrollo del pericarpio (Figura 2.16 b, Capítulo 2). En este contexto, es relevante evaluar si el efecto del fotoperíodo sobre el nivel de dormición de los frutos de girasol está asociado con cambios en el contenido endógeno de ABA a cosecha y/o con cambios en la sensibilidad de esta hormona.

En base a lo expuesto precedentemente los objetivos planteados en este capítulo fueron: i) estudiar el efecto del fotoperíodo durante el período de llenado de los frutos de girasol sobre su patrón de salida de la dormición luego de la cosecha, ii) evaluar en qué medida los efectos sobre el nivel de dormición observados en i) se encuentran determinados por cambios en la dormición impuesta por las cubiertas y/o por cambios en la dormición embrionaria; iii) establecer en qué medida los efectos del fotoperíodo sobre el nivel de dormición están mediados por cambios: a) en la morfología de las cubiertas seminales (pericarpio y membrana seminal) y/o b) en el contenido de ABA endógeno a cosecha y/o en la sensibilidad a esta hormona.

### **3.2 MATERIALES Y METODOS**

### 3.2.1 Sitio y condiciones de crecimiento

Se realizaron dos experimentos durante las campañas 2010-11 (Exp1), 2011-12 (Exp2) en el campo experimental de la Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires (34° 35´S 58° 29´O) para determinar el efecto del fotoperíodo sobre la dormición en frutos de girasol. Se utilizó la misma línea parental endocriada de girasol (*Helianthus annuus* L.) que en los experimentos descritos en el Capítulo 2. El suelo fue franco arcillo limoso (Argiudol vértico, Taxonomía de suelos USA). Ambos experimentos se sembraron en el mes de enero para obtener una diferencia de aprox. de 2 horas en la duración del día entre el fotoperíodo natural y el fotoperíodo extendido artificialmente durante el período de llenado de granos. Los experimentos se condujeron sin limitaciones hídricas y nutricionales. La siembra se realizó en forma manual a chorrillo. La densidad final (i.e. 5.1 pl.m<sup>-2</sup>) se logró mediante la realización de dos raleos (i.e. en post-emergencia y con el primer par de hojas expandidas). Se controlaron las malezas en forma manual y se realizaron aplicaciones periódicas de insecticidas y fungicidas para mantener las plantas libres de adversidades bióticas. En botón floral (R3, el entrenudo por debajo del botón reproductivo continúa elongándose llevando la inflorescencia a más de 2 cm por encima de las hojas, según la escala de Schneiter y Miller, 1981) se cubrieron los capítulos con bolsas de polipropileno blancas para facilitar la autopolinización y evitar los daños ocasionados por pájaros y/o cotorras durante el desarrollo y crecimiento de los frutos.

### 3.2.2 Diseño experimental y tratamientos

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 3 (Exp1) y 4 (Exp2) repeticiones. Los tratamientos de ambos experimentos fueron: i) 12 hs (i.e. fotoperíodo natural, control) y ii) 14 hs (i.e. fotoperíodo extendido, Figura 3.1) durante todo el período de llenado de grano (i.e. desde fin de anthesis hasta madurez fisiológica). Las dimensiones de cada parcela fueron de 4 m<sup>2</sup> (3 surcos de 2 m de longitud distanciados a 0.70 m entre surcos). Entre las parcelas se dejaron 3 surcos (aprox. 2 m de distancia) de bordura, de forma tal de evitar interferencias entre los tratamientos de duración del día impuestos en parcelas linderas. La duración del día se extendió mediante el uso de tubos fluorescentes de baja intensidad y lámparas incandescentes que se ensamblaron sobre una estructura de metal rectangular de 2 m de alto, ancho y largo. La calidad y la cantidad de luz que emiten las lámparas incandescentes y los tubos fluorescentes se midieron al atardecer con un sensor Skye SKR 110 660/730 (Skye Instruments Ltd,

Landrindod Wells, Powys, UK) y con un sensor cuántico lineal de 1 m (Li-COR LI 191S, LI-Cor) respectivamente. Para el encendido y apagado de las luces se utilizaron temporizadores automáticos, cuya programación se actualizó semanalmente para mantener las diferencias en la duración del día entre ambos tratamientos.



**Figura 3.1:** Vista aérea de los experimentos de extensión del fotoperíodo durante la aplicación de los tratamientos.

### 3.2.3 Mediciones, observaciones y cálculos

#### 3.2.3.1 *Condiciones ambientales*

Se registraron los valores de temperatura máxima y mínima diaria y de la radiación incidente diaria durante el ciclo del cultivo mediante una estación meteorológica situada a 600 m del campo experimental (SMN, Estación Meteorológica EMA Ortúzar).

#### 3.2.3.2 *Fenología*

Se registró la fecha de ocurrencia de los siguientes estados fenológicos: emergencia, primera antesis [PA, inicio de antesis, estadio R5.1 según la escala de Schneiter y Miller (1981)], fin de antesis [FA, la antesis está completa y las flores liguladas perdieron turgencia, R6 según la escala de Schneiter y Miller (1981)], madurez fisiológica (MF, estimada como el momento en que el peso de grano registra variaciones menores al 5%, ver metodología en la apartado 2.2.3.2 de Materiales y Métodos del Capítulo 2) y madurez de cosecha (i.e. cuando el porcentaje de humedad de los frutos fue cercano al 12%).

#### 3.2.3.3 *Cosecha, acondicionamiento y almacenamiento de los frutos*

Los capítulos se cosecharon cuando el porcentaje de humedad de los frutos fue igual o menor al 12%, se trillaron y mediante el uso de un tamiz de tajo se eliminaron

los frutos que tenían un tamaño menor a 2.75 mm. Luego los frutos de cada tratamiento y repetición se almacenaron en una bolsa de red y se secaron mediante el uso de una secadora experimental de aire forzado con control de temperatura a 36°C, hasta que el porcentaje de humedad de los frutos fue cercano al 6%; según el protocolo de manejo de post-cosecha utilizado en la producción de semilla comercial. Finalmente, los frutos se almacenaron en cámara a 12°C en bolsas de papel.

#### *3.2.3.4 Morfología de las cubiertas seminales*

La morfología del pericarpio y de la membrana seminal se evaluó en los dos tratamientos de duración del día (i.e. 12 hs y 14 hs) de ambos experimentos. Para ello se eligieron al azar cuatro frutos a cosecha de cada tratamiento y repetición. Los preparados histológicos del pericarpio y de la membrana seminal se realizaron siguiendo la metodología de inclusión en parafina de Johansen (1940, ver descripción de la metodología en apartado 2.2.3.5 de Materiales y Métodos del Capítulo 2). Finalmente, se tomó una fotografía representativa con una escala de 10 y de 100X para evaluar el pericarpio y la membrana seminal respectivamente, con una cámara AxioCam HRc anexada a un microscopio óptico marca Zeiss Axioplan (Alemania). Las fotografías se analizaron mediante el uso del software Zeiss AxioCam ERc 5s (Jena, Alemania). En cada fotografía se realizaron cuatro mediciones del espesor de pericarpio (capa oscura + capa media) y el número de estratos de la capa media. Mientras que, en el caso de la membrana seminal se midió el tamaño (i.e. alto y ancho) de 10 células.

#### *3.2.3.5 Control hormonal de la dormición: Contenido de ABA endógeno a cosecha*

El contenido de ABA endógeno se evaluó en los dos experimentos de extensión del fotoperíodo (i.e. 12 hs y 14 hs). El contenido de ABA se midió mediante radioinmunoensayo (Steinbach *et al.*, 1995). Un grupo de los frutos acondicionados a cosecha de cada tratamiento y repetición (ver apartado 3.2.3.3) fueron congelados en nitrógeno líquido durante 30 segundos y almacenados en un freezer a -80°C hasta su medición. Para ello, se extrajeron 25 semillas de cada tratamiento y repetición se liofilizaron, molieron, pesaron y finalmente 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).

#### *3.2.3.6 Control hormonal de la dormición: Sensibilidad al ABA*

La sensibilidad al ABA se evaluó por única vez a los 30 días después de la cosecha, en los dos tratamientos (i.e. 12 hs y 14 hs) de ambos experimentos. Los medios de incubación utilizados consistieron en las siguientes soluciones de hormonas puras y/o combinadas: i) Agua destilada; ii) Agua destilada + Fluridone 100  $\mu\text{M}$ ; iii) Agua destilada + Fluridone 100  $\mu\text{M}$  + ABA 10  $\mu\text{M}$ ; y iv) Agua destilada + Fluridone 100  $\mu\text{M}$  + ABA 100  $\mu\text{M}$ .

#### 3.2.4 Experimentos de germinación

Para evaluar la evolución del porcentaje de germinación durante la pos-cosecha se realizaron test de germinación de las cipselas cada 20 días a partir del momento de cosecha y hasta que la proporción de frutos que germinaban fue igual o superior al 85% (según las reglas de ensayos de semillas de ISTA, Resolución 2270/93 del INASE - SAGPyA). Para evaluar el efecto de las cubiertas seminales sobre la imposición de la dormición se realizaron test de germinación con el fruto completo (i.e. cipsela) y con la semilla (i.e. cipsela sin pericarpio). El pericarpio se removió mediante un corte en la región micropilar con un bisturí.

Las pruebas de germinación se realizaron sobre cajas de Petri plásticas de 90 mm de diámetro. En cada una, sobre dos capas de papel de filtro a las cuales se le adicionó 4 ml de agua destilada o de soluciones de hormonas puras y/o combinadas, según lo descripto precedentemente. Luego se dispusieron 25 cipselas o semillas elegidas al azar del grupo de frutos de cada tratamiento y repetición. Posteriormente, se sellaron con film adherente para evitar pérdidas de agua por evaporación. Por último, las cajas se colocaron en cámaras de germinación (con una variación de temperatura de  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) en oscuridad por un lapso de 15 días. En el Exp1, se utilizaron dos temperaturas de incubación (i.e. 12 y  $25^\circ\text{C}$ ; Corbineau *et al.*, 1988; Corbineau *et al.*, 1990; Benech-Arnold, 2004 y Ceccato *et al.*, 2011). Mientras que en el Exp2 se incubaron únicamente a  $25^\circ\text{C}$ . Día por medio, por un lapso de 15 días se realizaron recuentos de germinación, se retiraron las cipselas y/o semillas que germinaron y se registró el porcentaje de germinación (PG) final. Se consideró que una cipsela había germinado cuando se observó la protrusión de la radícula, mientras que en el caso de las semillas se consideró que habían germinado cuando la radícula se hizo visible (i.e.  $\approx 3$  mm).

#### 3.2.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de variancia para todos los atributos medidos y estimados en este capítulo mediante el uso del paquete estadístico Infostat (InfoStat versión libre 2009, Di Rienzo *et al.*, 2012). Antes de realizar los análisis de variancia se chequeó que los datos cumplieran con los supuestos (homogeneidad de la varianza, observaciones independientes, distribución normal) de este análisis estadístico. En los casos en que, los datos no los cumplieran se utilizó la transformación arcoseno (Little y Hills, 1975). Una vez realizada la transformación de los datos se hicieron nuevamente los test para determinar si los datos transformados cumplían con estos supuestos. Los valores de las variables en las figuras y tablas corresponden a los porcentajes previos a la transformación.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Caracterización del ambiente durante el ciclo de cultivo

La Tabla 3.1 sintetiza el patrón estacional que mostraron las variables ambientales en los Exp1-2. La duración de las etapas S-An y An-MF fue similar entre ambos experimentos (i.e. 73 días para S-An para ambos experimentos y 34 y 35 días para An-MF para el Exp1-2 respectivamente) debido a que la temperatura máxima y mínima media en ambas etapas de desarrollo fue similar en ambos experimentos. En contraposición, la radiación incidente durante el período de llenado de grano registró una caída de la radiación del 30% comparada con la etapa de S-An en ambos experimentos.

**Tabla 3.1:** Datos meteorológicos promedio y duración de las fases de Siembra-Antesis (S-An) y Antesis-Madurez Fisiológica (An-MF) de los dos experimentos de extensión del fotoperíodo. Fotoperíodo (Fotop., hs), temperatura máxima media (T<sub>máx.</sub>, °C), temperatura mínima media (T<sub>mín.</sub>, °C) y radiación incidente diaria (RI., MJ m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup>). Datos de la Estación Meteorológica EMA Ortúzar ubicada a 600 metros de los experimentos.

Experimento	Fases de desarrollo del cultivo	Fotop. (hs)	T <sub>máx</sub> (°C)	T <sub>mín</sub> (°C)	RI (MJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )
Exp1					
Fecha de siembra (25 de enero)	S - An (73 días)	13.6 ± 0.7	28.1 ± 3.2	18.5 ± 3.6	18.8 ± 5.1
	An - MF (34 días)	11.8 ± 0.3	22.1 ± 3.2	12.3 ± 3.5	11.8 ± 3.5
Exp2					
Fecha de siembra (06 de febrero)	S - An (73 días)	13.2 ± 0.7	27.5 ± 3.3	17.2 ± 3.7	16.7 ± 4.7
	An - MF (35 días)	11.5 ± 0.3	20.2 ± 3.7	11.7 ± 3.6	9.6 ± 4.1

### 3.3.2 Caracterización del ambiente lumínico durante el período de extensión del fotoperíodo

Las lámparas incandescentes y los tubos fluorescentes que se utilizaron para prolongar la duración del día no modificaron la calidad de la luz, ni tampoco la cantidad de radiación incidente que recibieron las plantas del tratamiento de extensión del fotoperíodo en comparación con sus respectivos controles. La relación R/RL fue de 1.1, valor similar a la radiación solar. Mientras que, el flujo de fotones de las lámparas fue extremadamente bajo ( $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), inferior al punto de compensación lumínica de la fotosíntesis en esta especie (Hernández y Orioli, 1994).

### 3.3.3 Dinámica del crecimiento y peso a madurez fisiológica del grano

La duración del fotoperíodo durante el período de crecimiento de los frutos no afectó el peso del grano en ambos experimentos. La duración del período de llenado de grano como así también la tasa de llenado fue similar entre ambos tratamientos de fotoperíodo, en ambos experimentos (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2:** Peso final y sus determinantes (i.e. tasa y duración del período de llenado de grano) del control (12 hs) y del tratamiento de extensión del fotoperíodo (14 hs) del Exp1 y 2. Coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de la función de ajuste del peso de grano en función de los días después de anéxido del control y del tratamiento de extensión del fotoperíodo. Medias ± un error estándar seguidas con la misma letra indican que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) entre tratamientos para cada experimento.

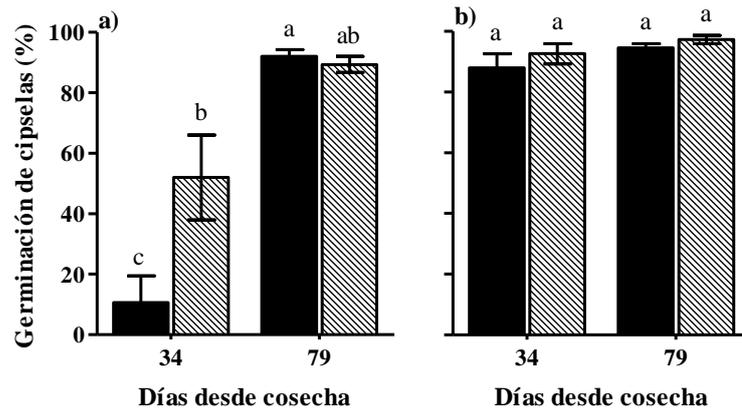
Experimento	Tratamiento	Peso final del grano (mg)	Tasa de llenado (mg día <sup>-1</sup> )	Duración del período de llenado (días)	R <sup>2</sup>
Exp1	12 hs	43.6 ± 2.1 a	1.1 ± 0.1 a	34.3 ± 1.7 a	0.94
	14 hs	42.8 ± 1.9 a	1.0 ± 0.1 a	33.9 ± 2.4 a	0.94
Exp2	12 hs	42.9 ± 2.4 a	1.2 ± 0.1 a	34.6 ± 1.3 a	0.93
	14 hs	38.6 ± 3.4 a	0.9 ± 0.2 a	34.1 ± 3.2 a	0.66

### 3.3.4 Nivel de dormición de los frutos a cosecha y salida de la dormición

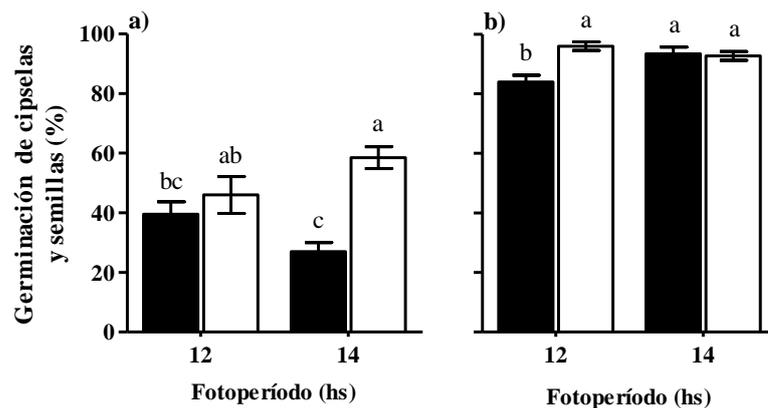
Los efectos de la duración del día durante el período de llenado sobre la dormición fueron poco notorios, e incluso, no hubo consistencia entre los resultados obtenidos en ambos experimentos. A los 34 días después de la cosecha en el Exp1 las cipselas incubadas a 12°C del tratamiento de 14 hs (fotoperíodo extendido) presentaron un PG significativamente mayor que el PG de los cipselas del control ( $p < 0.05$ , Figura 3.2 a). Cuando las cipselas se incubaron a 25°C, el PG del control y del tratamiento de 14 hs fue del 90%, sin diferencias significativas entre tratamientos (Figura 3.2 b). El hecho de que las diferencias en el PG entre ambos tratamientos se hayan expresado solo a bajas temperatura de incubación (i.e. 12°C) sugiere que el fotoperíodo afectó la dormición embrionaria. Estas diferencias desaparecieron a los 79 días desde la cosecha; las cipselas incubadas a 12°C de ambos tratamientos de fotoperíodo presentaron un PG cercano al 90% (Figura 3.2 a).

En contraposición, la incubación a 25°C de semillas y cipselas a los 23 días después de la cosecha del Exp2 mostró que la duración del día no afectó la dormición embrionaria ni tampoco la impuesta por las cubiertas del grano. No se registraron diferencias significativas entre el PG de las cipselas (barras negras, Figura 3.3 a) y de las semillas (barras vacías, Figura 3.3 a) de ambos tratamientos de fotoperíodo. Sin embargo, el contraste entre el PG de las semillas y cipselas a los 23 días después de la cosecha de cada tratamiento de fotoperíodo del Exp2 mostró que la duración del día afectó la proporción de la dormición explicada por el embrión y las cubiertas (Figura 3.3 a). La ausencia de diferencias significativas entre el PG de las semillas y de las cipselas provenientes del control (barras negras vs barras blancas del tratamiento de 12 horas; Figura 3.3 a) mostró que bajo fotoperíodos cortos la dormición sería

exclusivamente de origen embrionario. Mientras que, en el caso de frutos que se desarrollaron y crecieron bajo fotoperíodos largos (14 horas) coexistieron ambos tipos de dormición. A pesar de lo anteriormente expuesto y en forma similar a lo que sucedió en el Exp1, el PG de las semillas y de las cipselas a los 53 días después de la cosecha de ambos tratamientos fue superior al 85%, observándose solo leves diferencias entre tratamientos (Figura 3.3 b).



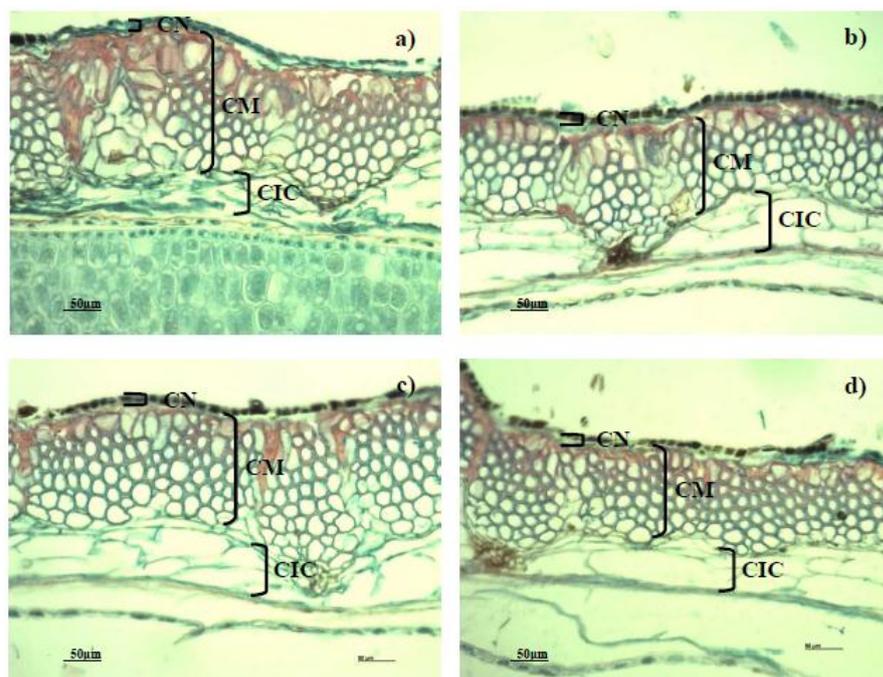
**Figura 3.2:** Porcentaje de germinación de cipselas incubadas a 12°C (Figura a) y 25°C (Figura b) del control (12 hs, barras negras) y del tratamiento de extensión del fotoperíodo (14 hs, barras rayadas) durante el período de llenado del grano a los 34 y 79 días después de la cosecha del Exp1. El porcentaje de germinación de las cipselas se evaluó hasta que alcanzó un valor  $\geq 85\%$ . Las líneas verticales sobre los símbolos indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y días después de la cosecha para cada temperatura de incubación.



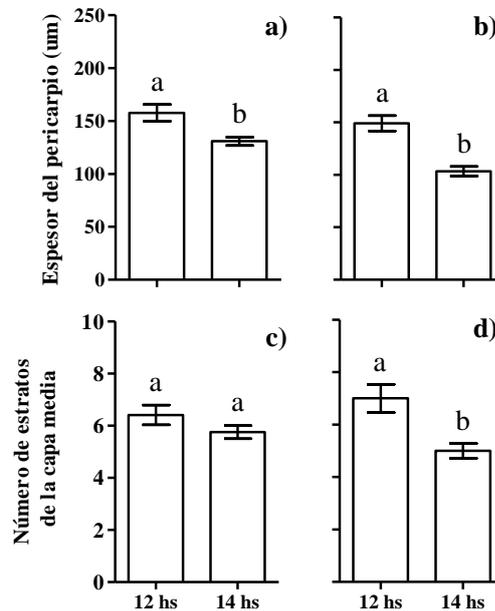
**Figura 3.3:** Porcentaje de germinación de cipselas (barras negras) y semillas (barras blancas) del control (12 hs.) y del tratamiento de extensión del fotoperíodo (14 hs) durante el período de llenado de grano a los 23 (Figura a) y 53 (Figura b) días después de la cosecha incubados a 25°C del Exp2. El porcentaje de germinación de las cipselas se evaluó hasta que alcanzó un valor  $\geq 85\%$ . Las líneas verticales indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos y estructura seminal (i.e. cipsela y semilla) para cada momento de evaluación.

### 3.3.5 Morfología de las cubiertas seminales y su asociación con la dormición

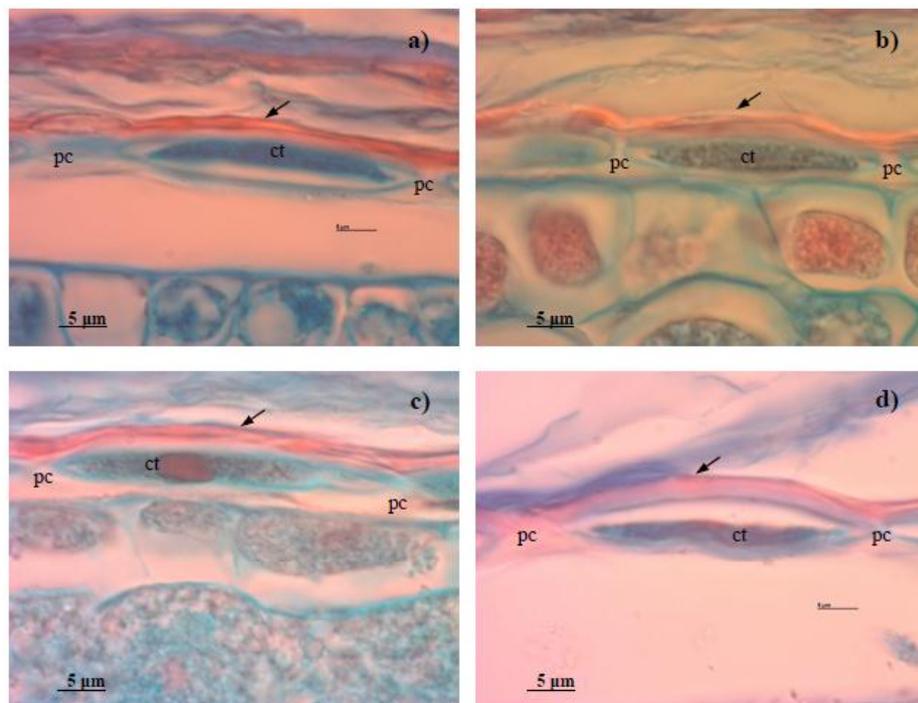
La evaluación de las características morfológicas del pericarpio (i.e. espesor y número de estratos de la capa media) y de la membrana seminal (i.e. ancho y largo de las células que la componen) en ambos experimentos demostró que los cambios en la duración del día durante el período de llenado de grano afectaron las características morfológicas del pericarpio (i.e. espesor y del número de estratos de la capa media; Figura 3.4) de los frutos a cosecha, pero no la membrana seminal (Figura 3.6). En ambos experimentos, el espesor de la capa media del pericarpio del tratamiento de 14 hs (fotoperíodo extendido) fue significativamente menor que la capa media de los frutos que se desarrollaron y crecieron bajo fotoperíodo natural (12 hs) durante el período de llenado ( $p < 0.05$ , Figuras 3.5 a y b). Los cambios en el espesor de la capa media pueden ser atribuidos a una reducción en el número estratos que constituyen esta capa y/o a un menor tamaño de las células. No se produjeron cambios en el número de estratos de la capa media de ambos tratamientos en el Exp1 ( $p > 0.05$ , Figura 3.5 c). En contraposición, el número de estratos de la capa media de las cipselas que crecieron con fotoperíodos largos en el Exp2 tuvieron menos estratos que la capa media de las cipselas que crecieron con fotoperíodos cortos ( $p < 0.05$ ; Figura 3.5 d). En forma similar a lo que sucedió con la radiación, el fotoperíodo no afectó la membrana seminal (Figuras 3.6 y 3.7). No se detectaron diferencias significativas en el ancho y largo de células de esta membrana ( $p > 0.05$ ) entre ambos tratamientos en ambos Exp1-2 (Figura 3.7).



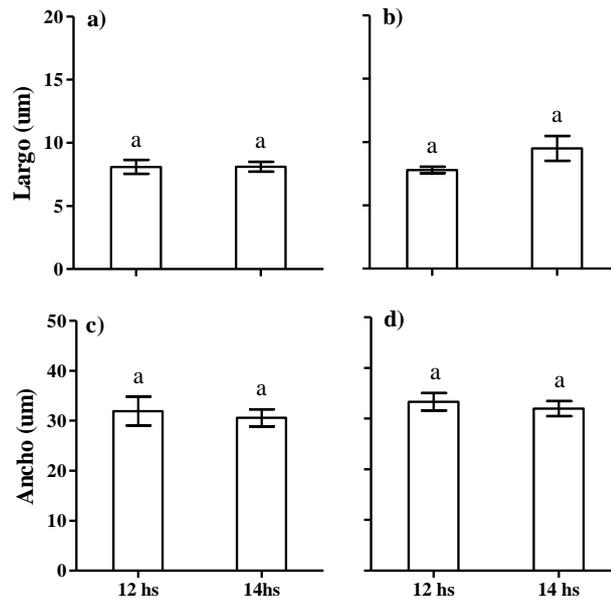
**Figura 3.4:** Cortes transversales de pericarpios de cipselas de girasol cultivados bajo un fotoperíodo natural (control: 12 hs; a y c) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs; b y d) durante el período de llenado del grano del Exp1 (a y b) y del Exp2 (c y d). Referencia: capa negra, CN; capa media, CM; y capa interna comprimida, CIC. La barra de escala para todas las imágenes fue de 50 $\mu$ m.



**Figura 3.5:** Espesor del pericarpio (a y b) y número de estratos de la capa media (c y d) provenientes de cipselas del control (fotoperíodo natural: 12 hs) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs) durante el período de llenado del grano del Exp1 (a y c) y del Exp2 (b y d). Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para cada experimento.



**Figura 3.6:** Cortes transversales de membrana seminal de cipselas de girasol del control (fotoperíodo natural: 12 hs; a y c) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs; b y d) durante el período de llenado del grano del Exp1 (a y b) y del Exp2 (c y d). Referencias: cutícula gruesa (flecha), pared celular (pc) y citoplasma (ct). La barra de escala para todas las imágenes fue de 5 $\mu$ m.

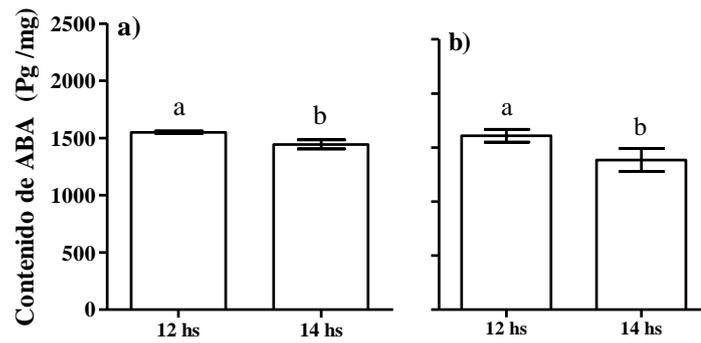


**Figura 3.7:** Largo (a y b) y el Ancho (c y d) de las células que componen la membrana seminal de cipselas provenientes del control (fotoperíodo natural; 12 hs) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs) durante el período de llenado del grano del Exp1 (a y c) y del Exp2 (b y d). Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras similares sobre las barras indican que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para cada experimento.

### 3.3.6 Control hormonal de la dormición

#### 3.3.6.1 Contenido de ABA endógeno a cosecha

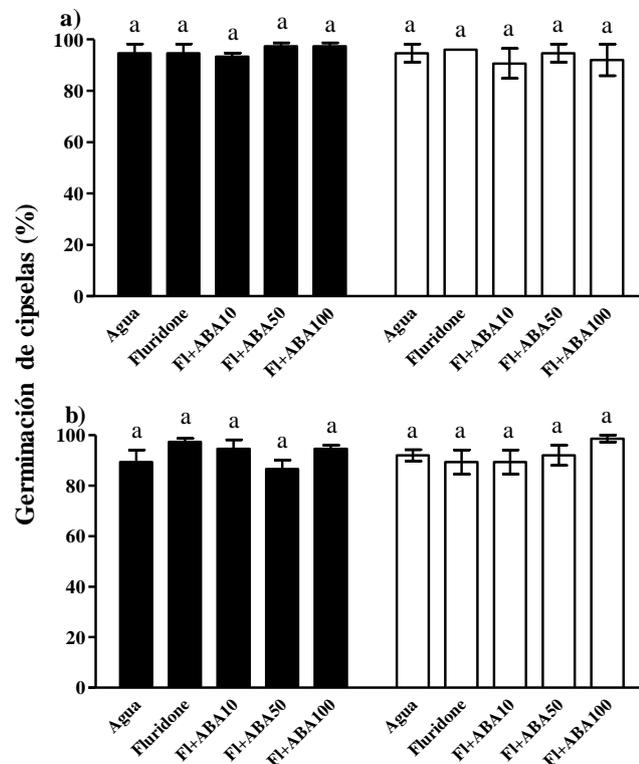
La medición del contenido de ABA endógeno en el control (fotoperíodo natural, 12 hs) y en el tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs) durante el período de llenado y la posterior realización de un análisis de variancia demostró que la duración del día afectó el contenido de ABA endógeno. El contenido de ABA endógeno de las semillas que crecieron bajo fotoperíodos cortos fue significativamente mayor que el registrado en las semillas que crecieron bajo fotoperíodos largos en ambos experimentos (Figura 3.8). Nótese que el contenido de ABA endógeno promedio de ambos tratamientos fue similar entre experimentos.



**Figura 3.8:** Contenido endógeno de ABA de semillas de girasol a cosecha provenientes del control (fotoperíodo natural; 12 hs) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs) durante el período de llenado del grano del Exp1 (Figura a) y del Exp2 (Figura b). Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.6.2 Sensibilidad al ABA

La evaluación de la sensibilidad al ABA en cipselas que provenían del control (fotoperíodo natural) y del tratamiento de extensión del fotoperíodo durante el período de llenado de grano no evidenció un efecto del fotoperíodo sobre este carácter. El PG de las cipselas provenientes de ambos tratamientos de duración del día incubados en diferentes medios con cantidades crecientes de ABA fue similar al PG de las cipselas incubadas con Fluridone en ambos experimentos (Figura 3.9).



**Figura 3.9:** Porcentaje de germinación de cipselas de girasol a cosecha provenientes de un fotoperíodo natural (control: 12 hs; barras negras) y del tratamiento de fotoperíodo extendido (14 hs; barras blancas) del Exp1 (a) y Exp2 (b) incubados a 25°C en diferentes medio de incubación: en Agua, Fluridone 100 $\mu$ M,

Fluridone 100 $\mu$ M + ABA 10 $\mu$ M (FI+ABA10), Fluridone 100 $\mu$ M + ABA 50 $\mu$ M (FI+ABA50), Fluridone 100 $\mu$ M + ABA 100 $\mu$ M (FI+ABA100). Las líneas verticales sobre las barras indican  $\pm$  un error estándar de la media. Letras similares sobre las barras indican que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos y medio de incubación.

### 3.4 DISCUSIÓN

El análisis conjunto de los resultados de los dos experimentos de extensión del fotoperíodo durante el período de llenado de grano puso en evidencia que la duración del día no afectó de manera significativa el nivel de dormición de los frutos de girasol. El similar PG de las cipselas del Exp1 (Figura 3.2 b) y Exp2 (ver barras negras, Figura 3.3) incubadas a 25°C y de las semillas del Exp2 (barras blancas Figura 3.3) de ambos regímenes fotoperiódicos confirman esta aseveración. La única excepción a esto fueron las diferencias detectadas en el PG de las cipselas entre ambos tratamientos de duración del fotoperíodo del Exp1, cuando se incubaron a 12°C (Figura 3.3). La no variación del nivel dormición en respuesta a la duración del día pudo haber tenido su origen en dos causas de distinto orden: i) el cultivar utilizado en estos experimentos posee una respuesta neutra al fotoperíodo, es decir el TT de la fase emergencia-floración (E-FI) fue de 1445°Cd (Tb de 4°C) tanto para la FS normal ( $Fp_{E-FI}$ : 15.4hs, experimentos del Capítulo 2) como para la FS tardía ( $Fp_{E-FI}$ : 13.3hs, tratamiento 12 hs de los experimentos del Capítulo 3). Existen indicios que muestran que los genes involucrados en el control de la floración (i.e. LOCUS T FLOWERING, LOCUS T FLOWERING, entre otros) afectan la dormición de semillas de *Arabidopsis* (Penfield y MacGregor, 2017). Sin embargo, este acoplamiento entre los genes de fotoperíodo y el metabolismo de las cubiertas de las semillas (i.e. cambios en la funcionalidad de las cubiertas seminales debido a sus propiedades físicas y químicas) que alteran la expresión de la dormición de las mismas no es una condición excluyente para que el fotoperíodo afecte la dormición. Así, por ejemplo y a pesar de que las plantas de pepino fueron insensibles al fotoperíodo para los días a floración, la dormición fue promovida por días largos durante el crecimiento de los frutos (Gutterman, 1978; Penfield y MacGregor; 2017); y ii) los tratamientos de fotoperíodo se impusieron una vez que finalizó la antesis (i.e. al comienzo del período de llenado efectivo del grano) momento en el cual ya cesó el crecimiento del pericarpio. En este sentido, Imaizumi *et al.*, (2017) sugieren que el régimen fotoperiódico que experimentan las plantas no sólo en la fase reproductiva sino

también en la fase pre-reproductiva parecen influir en el comportamiento de la germinación de *Arabidopsis thaliana*.

A pesar de que el fotoperíodo no afectó el PG de las semillas y de las cipselas, el porcentaje de la dormición explicada por el embrión y por las cubiertas del fruto fue diferente según la condición fotoperiódica a la que estuvieron expuestas las cipselas. La dormición embrionaria explicó la dormición de las cipselas expuestas a fotoperíodos cortos (i.e. barra negra vs barra blanca en el tratamiento de 12 horas; Figura 3.3 a). En contraposición, la dormición impuesta por las cubiertas y la dormición embrionaria explicaron en proporciones aproximadamente similares la dormición de las cipselas que crecieron bajo fotoperíodos largos (i.e. barra negra vs barra blanca del tratamiento de 14 horas; Figura 3.3 a). Si bien la dormición impuesta por las cubiertas del fruto se pierde más lentamente durante la post-cosecha que la dormición embrionaria (Benech-Arnold, 2004), no se registraron diferencias en la salida de la dormición de los frutos que crecieron en ambos regímenes fotoperiódicos (a los 54 días después de la cosecha el PG de las cipselas fue superior al 80%; Figura 3.2 b). Coincidentemente, Ceccato *et al.* (2011) mostraron que las semillas de *Chenopodium quinoa* que crecieron con fotoperíodos cortos y bajas temperaturas presentaron también una menor dormición impuesta por las cubiertas y un aumento de la dormición embrionaria en comparación con semillas cultivadas bajo fotoperíodos largos y altas temperaturas. Sin embargo, y a diferencia de los resultados presentados en este capítulo para el girasol, la salida de la dormición de las semillas *Chenopodium quinoa* que crecieron bajo fotoperíodos cortos fue más rápida que la de las semillas que se desarrollaron bajo fotoperíodos largos.

La realización y el estudio de los cortes histológicos de las cubiertas de los frutos puso en evidencia que la extensión del fotoperíodo durante la etapa de llenado del grano afectó el espesor de las cubiertas de los frutos (Figura 3.5 a y b). Sin embargo, la variación del espesor de la pared del pericarpio no se correlacionó con el nivel de dormición. A pesar de que la importancia relativa de ambos tipos de dormición (i.e. dormición embrionaria e impuesta por las cubiertas del fruto) varió con el régimen fotoperiódico, no se detectaron diferencias en el PG de los frutos (Figura 3.3 a). Estos resultados sugieren que los cambios en el grosor de las cubiertas, en el rango de condiciones ambientales exploradas en los experimentos presentados en este capítulo, no afectaron el nivel de dormición de los frutos cultivados en un diferente régimen

fotoperiódico; aportando evidencias de que el grosor del pericarpio *per se* no afectaría el nivel de dormición de los frutos. Una mayor deposición de polifenoles y/u otro tipo de alteraciones que pueden producirse en la membrana seminal o en las cubiertas del pericarpio podrían afectar la dormición de los frutos de girasol (Leon-Kloosterziel *et al.*, 1994; MacGregor *et al.*, 2015; Penfield y MacGregor; 2017).

El hecho de que el agregado de ABA exógeno al medio de incubación no produjo, en todo el rango de concentraciones explorado, una disminución diferencial de los niveles de dormición de los frutos provenientes de ambos tratamientos de fotoperíodo sugiere que la sensibilidad al ABA no estaría relacionada en forma directa en la regulación de la salida de la dormición. Debido a que la sensibilidad al ABA se midió únicamente en cipselas, debería considerarse para investigaciones futuras la medición de esta variable en semillas a fin de descartar cualquier interferencia que generen las cubiertas del fruto al acceso del ABA al embrión. Por otro lado, los efectos del fotoperíodo sobre el contenido de ABA endógeno (Figura 3.8) podrían explicar las diferencias en el nivel de dormición de los frutos que se registraron entre los tratamientos de fotoperíodo (Figuras 3.2 a y 3.3 b). Los tratamientos de fotoperíodo cortos coincidieron en presentar un mayor contenido endógeno de ABA y menor PG de sus frutos, aunque existieron diferencias en la temperatura de incubación según el experimento. Los mayores contenidos de ABA en el Exp2, podrían explicar las diferencias observadas en el PG de los frutos incubados a 25°C (Figura 3.3 b). No se encontró en la bibliografía consultada referencias sobre este tema; en la mayoría de los trabajos examinados se encontraron referencias del efecto del fotoperíodo sobre la dormición a través de su efecto sobre las cubiertas seminales (Fenner, 1991).

## CAPÍTULO 4:

### **DISCUSIÓN GENERAL**

#### 4.1 ANALISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE RADIACIÓN Y DE FOTOPERÍODO

Bodrone *et al.* (2017) demostraron que la dormición disminuye a medida que la fecha de siembra de los cultivos de girasol se retrasa. Cambios en la temperatura máxima media diaria durante el período de llenado de grano explicaron parcialmente los efectos sobre el nivel de dormición de las fechas de siembra tardías (Bodrone *et al.*, 2017). Adicionalmente, en los Capítulos 2 y 3 de esta tesis se demostró que la radiación incidente y no el fotoperíodo, podría ser el otro factor que explique al menos una parte de la variación en el nivel de dormición de los frutos debido a un retraso en la fecha de siembra.

Existe una gran cantidad de información en la bibliografía que muestra la asociación entre el espesor del pericarpio y el nivel de dormición de los frutos en especies espontaneas y cultivadas. En el Capítulo 2 de esta tesis se mostró que hay una cierta correlación entre ambas variables (Figura. 2.12 a y b vs.  $PG_{50}$  en Tabla 2.4). En este mismo sentido, Vigliocco *et al.* (2017) demostró la existencia de cierta asociación entre el nivel de dormición y el grosor de la cubierta seminal en diferentes genotipos de girasol. Sin embargo, los cambios en el espesor del pericarpio (Figura 3.5 a y b) debidos al fotoperíodo no tuvieron correlación con el nivel de dormición de los frutos (Figura 3.2 b y barras negras en Figura 3.3 a). Adicionalmente, el espesor del pericarpio de los controles de los experimentos de Sombreo ( $187.9 \pm 39.8 \mu\text{m}$ ) y de Fotoperíodo ( $166,5 \pm 37,4 \mu\text{m}$ ) fueron similares, a pesar de que el nivel de dormición de sus frutos fue marcadamente contrastante. En los experimentos de sombreado, el 50% de las semillas germinaron a los 189 (control del Exp<sub>1</sub>, Tabla 2.4) y 114 (control del Exp<sub>2</sub>, Tabla 2.4) días después de la cosecha. Mientras que, en los experimentos de fotoperíodo a los 34 (control del Exp<sub>1</sub>, ver Figura 3.2 b) y a los 53 (control del Exp<sub>2</sub>, ver Figura 3.3 b) días después de la cosecha el porcentaje de germinación era ya, del 90%.

Por razones metodológicas, las diferentes fechas de siembra de los experimentos que se realizaron para determinar los efectos de la radiación (noviembre, ver Capítulo 2) y del fotoperíodo (enero, ver Capítulo 3) y los tratamientos de sombreado realizados en los experimentos del Capítulo 2 generaron profundas diferencias en : i) la oferta de recursos (i.e. radiación y temperatura) exploradas por los cultivos durante el período de llenado

de grano, ii) el tiempo requerido para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% de sus granos y, iii) en menor medida en el espesor del pericarpio y en el contenido de ABA endógeno entre experimentos y tratamientos. Debido a ello hemos realizado en esta sección un meta-análisis utilizando los datos de ambos capítulos para determinar la importancia de ambos factores del ambiente sobre la dormición de los frutos de girasol, y la asociación entre el espesor del pericarpio y el contenido de ABA endógeno con número de días para alcanzar un porcentaje de germinación del 50%.

En la Tabla 4.1 se sintetizan los experimentos, tratamientos y variables que se analizaron en esta sección. Se utilizaron los datos de los experimentos de sombreado realizados en diferentes estados de crecimiento y desarrollo del pericarpio (Exp<sub>1-2</sub>) y de estructuras de cultivo (Exp<sub>3</sub>) y el Exp2 de fotoperíodo. No se utilizaron los datos del Exp1 de fotoperíodo debido a que no se pudo calcular su PG<sub>50</sub>. A los pocos días de la cosecha el 90% de los frutos germinaron (i.e. el 90% de los frutos incubados a 25°C de ambos tratamientos de fotoperíodo geminaron a los 34 días después de la cosecha, ver Figura 3.2 b).

Debido a que los factores del ambiente que modifican la dormición son la temperatura máxima media diaria (Bodrone *et al.*, 2017) y la radiación incidente diaria (Capítulo 2 de esta tesis) se calcularon los valores diarios de estos factores desde el estadio fenológico R3 [entrenado ubicado por debajo de la inflorescencia tiene más de dos centímetros, según la escala de Schneiter y Miller (1981)] y hasta madurez fisiológica. Los valores de PG<sub>50</sub> del Exp2 de fotoperíodo se calcularon mediante la interpolación de los datos de PG<sub>50</sub> correspondientes a las dos fechas (i.e. a los 23 y a los 53 días después de la cosecha) en las que se realizaron los experimentos de germinación. A los 53 días después de la cosecha el porcentaje de germinación fue del 90%.

Se utilizaron regresiones simples y múltiples para evaluar el grado de asociación entre los atributos evaluados en esta sección. Las regresiones fueron realizadas mediante el uso del paquete estadístico Infostat (InfoStat versión libre 2009, Di Rienzo *et al.*, 2012).

**Tabla 4.1:** Datos de  $PG_{50}$  (días desde cosecha), Espesor de pericarpio ( $\mu\text{m}$ ), datos meteorológicos (Temperatura máxima media diaria,  $^{\circ}\text{C}$  y Radiación incidente media diaria,  $\text{MJ m}^{-2}\text{d}^{-1}$ ) y Contenido endógeno de ABA de semillas de girasol a cosecha ( $\text{Pg/mg}$ ) provenientes de los experimentos de sombreado realizados en diferentes estados [ $R3_{12d}$  (durante 12 días a partir de R3) en el  $\text{Exp}_1$ , A (desde primera antesis a fin de antesis) y  $FA_{12d}$  (durante 12 días a partir fin de antesis) en los  $\text{Exp}_{1-2}$ , y  $PA_{23d}$  (durante 23 días a partir de primera antesis) en el  $\text{Exp}_2$ ] durante el desarrollo y crecimiento del pericarpio en los  $\text{Exp}_{1-2}$  y de estructuras de cultivo [tratamientos de sombreado del cultivo ( $\text{SOMB}_{\text{CUL}}$ ) y del canopeo ( $\text{SOMB}_{\text{CAN}}$ )  $\text{Exp}_3$ ] y el  $\text{Exp}_2$  de fotoperíodo (12 y 14 hs). Cada columna indica el nombre de la variable y la media  $\pm$  un error estándar.

Experimentos	Tratamientos	$PG_{50}$ (días)	Espesor del Pericarpio ( $\mu\text{m}$ )	Temperatura Máx. Media Diaria ( $^{\circ}\text{C}$ )	Radiación Incidente Media Diaria ( $\text{MJ m}^{-2}\text{d}^{-1}$ )	Contenido de ABA ( $\text{Pg/mg}$ )
Sombreado						
$\text{Exp}_1$	control	$189.4 \pm 3.25$	$194.5 \pm 22.6$	$29.1 \pm 1.1$	$23.1 \pm 5.4$	$2094.9 \pm 15.1$
	$R3_{12d}$	$140.9 \pm 17.1$	$163.7 \pm 26.3$	$28.0 \pm 1.0$	$17.9 \pm 9.2$	$2144.4 \pm 17.3$
	A	$121.6 \pm 14.2$	$149.5 \pm 21.2$	$30.0 \pm 0.8$	$16.8 \pm 9.7$	$2131.4 \pm 18.3$
	$FA_{12d}$	$129.4 \pm 17.9$	$137.8 \pm 19.6$	$26.0 \pm 0.8$	$17.5 \pm 10$	$1881.2 \pm 19.3$
$\text{Exp}_2$	control	$117.3 \pm 2.9$	$180.9 \pm 31.3$	$29.0 \pm 0.9$	$19.1 \pm 5.3$	$1434.7 \pm 22.4$
	A	$115.4 \pm 3.4$	s/d	$28.0 \pm 1.0$	$14.8 \pm 8.2$	$1684.1 \pm 55.1$
	$FA_{12d}$	$71.5 \pm 11.0$	$142.2 \pm 27.2$	$27.0 \pm 1.0$	$14.3 \pm 8.6$	$1258.5 \pm 16.6$
	$PA_{23d}$	$81.4 \pm 7.8$	s/d	$27.0 \pm 0.6$	$10.1 \pm 8.4$	$1313.6 \pm 36.2$
$\text{Exp}_3$	control	$102.2 \pm 11.3$	$204.7 \pm 22.7$	$30.1 \pm 1.1$	$18.1 \pm 6.9$	sd
	$\text{SOMB}_{\text{CAN}}$	$46.3 \pm 15.7$	$157.6 \pm 18.1$	$28.1 \pm 1.1$	$13.9 \pm 9.7$	sd
	$\text{SOMB}_{\text{CUL}}$	$48.4 \pm 20.1$	$175.3 \pm 25.8$	$28.0 \pm 1.1$	$13.9 \pm 9.7$	sd
Fotoperíodo						
$\text{Exp}_2$	12 hs	$30.7 \pm 3.2$	$149.1 \pm 13.8$	$20.2 \pm 3.7$	$10.3 \pm 4.0$	$1606.7 \pm 33.6$
	14 hs	$33.4 \pm 1.4$	$103.5 \pm 13.3$	$20.2 \pm 3.8$	$10.3 \pm 4.0$	$1382.7 \pm 61.9$

El análisis de regresión múltiple entre el  $PG_{50}$  y los dos factores del ambiente que afectan la dormición (i.e. temperatura máxima media diaria y radiación incidente media diaria) demostró la relevancia de ambos factores del ambiente en la imposición de la dormición de los frutos de girasol. El 80 % de la variancia total que no es error fue explicado, en proporciones variables por la temperatura media máxima diaria y la radiación incidente media diaria (Tabla 4.2)

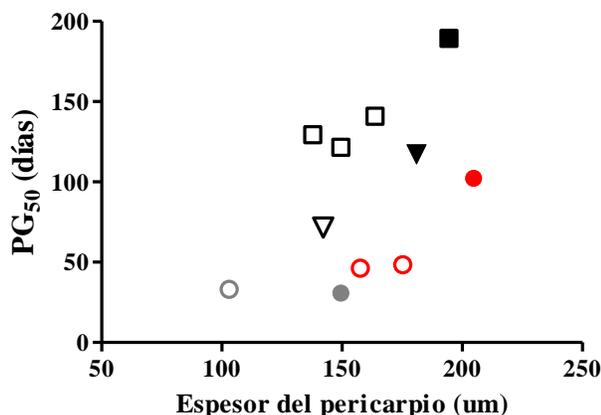
**Tabla 4.2:** Valores F, niveles de significancia en el ANOVA de los parámetros y el coeficiente ( $R^2$ ) de la regresión múltiple entre el número de días desde la cosecha para alcanzar un porcentaje de germinación de los frutos del 50% ( $PG_{50}$ ) y los factores del ambiente (i.e. temperatura máxima media diaria y la radiación incidente media diaria).

	Valores F		$R^2$
	Temperatura Max. Media Diaria (°C)	Radiación Incidente Media Diaria(MJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	
$PG_{50}$ (días)	22.0***	13.5**	0.78

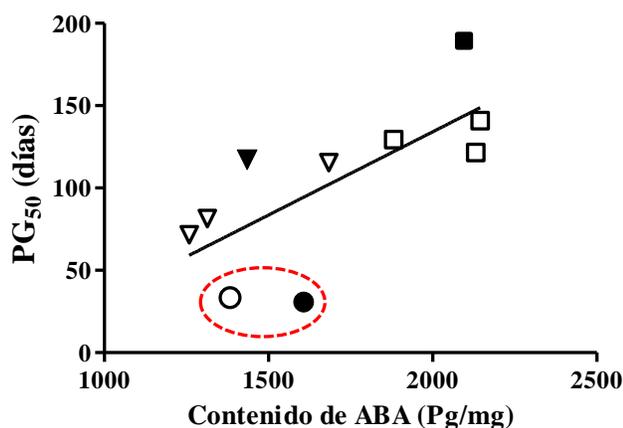
p<0.01(\*\*), p<0.001(\*\*\*)

La realización de un análisis de regresión entre los días después de la cosecha para alcanzar el 50% de germinación ( $PG_{50}$ ) y el espesor del pericarpio mostró que este carácter no se asoció con el nivel de dormición de los frutos de girasol. La falta de asociación entre el  $PG_{50}$  y el espesor del pericarpio confirman esta aseveración (p<0.12, Figura 4.1).

La asociación significativa y positiva entre el  $PG_{50}$  y el contenido de ABA endógeno, utilizando los valores de los Exp<sub>1-2</sub> de sombreado y del Exp2 de fotoperíodo (Figura 4.2), sugiere en una primera instancia que el contenido de ABA endógeno podría estar explicando la variación del  $PG_{50}$ . Sin embargo, el similar contenido de ABA de los frutos provenientes del Exp2 de fotoperíodo (i.e. círculos en la Figura 4.2) y del Exp<sub>1</sub> de sombreado (i.e. triángulos invertidos en Figura 4.2) y las notorias diferencias en el  $PG_{50}$  de los frutos de ambos experimentos (i.e. 30 vs 100 días para los experimentos de fotoperíodo y de sombreado respectivamente), sugieren que los cambios en la sensibilidad al ABA o la síntesis de ABA *de novo* podrían explicar estas diferencias en el  $PG_{50}$ .



**Figura 4.1:** Relación entre los días después de la cosecha para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG<sub>50</sub>) y el espesor del pericarpio de los frutos a cosecha de los Experimentos de sombreado (cuadrados y triángulos invertidos, Exp<sub>1-2</sub> respectivamente) realizados en diferentes momentos del crecimiento y desarrollo del pericarpio y diferentes estructuras de cultivo (círculos rojos vacíos) y, de fotoperíodo (círculos grises). Los cuadrados y triángulos invertidos sólidos y vacíos corresponden a los controles y a los distintos tratamientos de sombreado, respectivamente. Los círculos vacíos y llenos grises corresponden a los tratamientos de 12 y 14 horas de duración del día. Línea de regresión:  $-47.59+0.88x$ ,  $R^2=0.23$ ,  $p=0.12$ ,  $n=11$ .



**Figura 4.2:** Relación entre el número de días necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% (PG<sub>50</sub>) y el contenido endógeno de ABA de semillas de girasol provenientes de los Experimentos de sombreado (cuadrados y triángulos invertidos, Exp<sub>1-2</sub> respectivamente) realizados en diferentes momentos del crecimiento y desarrollo del pericarpio y, de fotoperíodo (círculos). Los símbolos sólidos y vacíos corresponden a los controles y a los distintos tratamientos de sombreado y extensión del fotoperíodo, respectivamente. El círculo rojo marca los valores correspondientes al experimento de fotoperíodo. Línea de regresión:  $-68.16+0.11x$ ,  $R^2=0.51$ ,  $p=0.020$ ,  $n=10$ .

**Tabla 4.3:** Valores F, niveles de significancia en el ANOVA del parámetro y el coeficiente ( $R^2$ ) de la regresión simple entre el PG<sub>50</sub> y el espesor del pericarpio ( $\mu\text{m}$ ). Los valores entre paréntesis próximos al valor F indican la proporción de la varianza no-error que es explicado por los factores fijos.

	Valores F	
	Espesor del Pericarpio ( $\mu\text{m}$ )	R <sup>2</sup>
PG <sub>50</sub> (días)	2.84 <sup>NS</sup>	0.23

NS (no significativo).

La discusión de los resultados de los análisis descriptos en este punto se realiza en la siguiente sección en forma conjunta con los resultados de los Capítulos 2 y 3 de esta tesis.

## 4.2 CONTRASTE DE HIPÓTESIS

En los capítulos anteriores se presentaron los resultados de los experimentos que se realizaron para avanzar en la comprensión de los efectos del ambiente materno (i.e. radiación incidente y fotoperíodo) sobre la regulación del nivel de dormición de los frutos de girasol. El efecto de la radiación incidente (i.e. sombreo) durante diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio [i.e. desde la última etapa de división celular de las paredes del ovario hasta que el pericarpio alcanza su máximo peso seco y finaliza la deposición de la pared secundaria] y del fotoperíodo durante el período de llenado de los frutos, sobre la dormición de girasol se evaluaron en los Capítulos 2 y 3 respectivamente. Además, en ambos capítulos se analizó la posible asociación entre los diferentes niveles de dormición y los cambios en la morfología de las cubiertas seminales (pericarpio y membrana seminal), y en la concentración y sensibilidad a las hormonas asociadas a la imposición y/o liberación de la dormición.

Los experimentos realizados en el Capítulo 2 demostraron, por primera vez, que la radiación incidente durante los diferentes estados de desarrollo y crecimiento del pericarpio afecta la velocidad de salida de la dormición durante la post-cosecha de los frutos de girasol del genotipo evaluado (Figura. 2.7 y Tabla 2.4). Debido a ello, se aceptó la hipótesis asociada al *objetivo 1* que dice que “una menor cantidad de radiación incidente durante el período de desarrollo y crecimiento de los frutos disminuye el nivel de dormición de los frutos de girasol”. Estos resultados pusieron en evidencia que la variación en la oferta de radiación incidente, además de la temperatura, puede explicar las variaciones en el nivel de dormición detectadas entre fechas de siembra por Bodrone *et al.* (2017). Un retraso en la

fecha de siembra no solo ocasiona una reducción en la temperatura y en la cantidad de radiación incidente durante el período de llenado de grano, sino también una menor duración del día durante esta etapa, pudiendo este último factor también regular la expresión del nivel de dormición como ha sido reportado en otras especies (Fenner, 1991, Ceccato *et al.*, 2011). Sin embargo, los experimentos realizados en el Capítulo 3 de esta tesis han servido para demostrar que el fotoperíodo no afecta significativamente el nivel de dormición de los frutos de girasol (Figuras 3.2 y 3.3) y que, por lo tanto, este factor no estaría involucrado en las variaciones en el nivel de dormición como consecuencia de variación en la fecha de siembra. Debido a ello se rechazó la hipótesis asociada al *objetivo* 2 que dice que “fotoperiodos cortos durante el período de crecimiento y maduración de los frutos disminuyen el nivel de dormición de los frutos de girasol”. El análisis de regresión múltiple entre el número de días necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% y los dos factores del ambiente que afectan la dormición (i.e. temperatura máxima media diaria y radiación incidente media diaria) (datos de los Experimentos de los Capítulos 2 y 3, ver Tabla 4.1) mostró que ambos factores explicaron una alta proporción (80%) de la variancia total que no es error (Tabla 4.1). La realización de un tercer experimento sirvió, además, para documentar que los efectos del sombreado (i.e. durante 12 días después de fin de antesis) sobre la actividad de la fuente afectan la dormición de los frutos de girasol (Figura 2.22 y Tabla 2.9). Es probable que en fechas de siembra tardías se produzca una caída en la tasa de crecimiento del cultivo debido a una menor oferta de los recursos (i.e. temperatura y radiación) y a una menor duración del área foliar en post-antesis. En los experimentos, de la Vega y Hall (2002) la radiación interceptada acumulada durante el período de llenado de grano en las fechas de siembra tardías disminuyó un 40% en comparación con las fechas de siembra temprana. La radiación incidente explicó solo un 16% de esa variación, mientras que el resto se debió a una menor duración del área foliar en post-antesis. En base a lo dicho precedentemente, en futuras investigaciones no solo se deberían evaluar los efectos de los factores del ambiente (i.e. temperatura y radiación), sino también el efecto de la variación de la duración del área foliar sobre el nivel de dormición de los frutos. Sin embargo, la importancia relativa de la duración del área foliar en post-antesis sobre el nivel de dormición dependerá del cultivar evaluado, debido a que existe

variabilidad en la respuesta de esta variable a cambios en la fecha de siembra (de la Vega y Hall, 2002).

La demostración de que la dinámica de la salida de la dormición de los tratamientos de sombreo realizados en diferentes etapas de desarrollo y crecimiento del pericarpio (Figura 2.7) fue similar, indica que no existiría un período de mayor sensibilidad de la dormición al sombreo, al menos durante la ventana de tiempo evaluada en esta tesis. En este contexto, y teniendo en cuenta que una menor actividad de la fuente afectó la dormición (Figura 2.22 y Tabla 2.9), es probable que el sombreo haya reducido el número de flores y/o embriones en proporciones variables en los distintos tratamientos de sombreo, de forma tal que la relación destino/fuente haya sido similar entre los distintos tratamientos de sombreo y que como consecuencia de ello no se hayan producido diferencias en la dormición entre los tratamientos de sombreo.

Los experimentos realizados en esta tesis se concentraron en evaluar los efectos del sombreo desde que se inicia el crecimiento de las paredes del ovario, el futuro pericarpio y hasta 12 días después de finalizada la floración. Es necesario evaluar en futuros experimentos el posible efecto de una menor oferta de radiación durante la etapa media y final de crecimiento efectivo del grano, debido a que el momento de exposición a bajos niveles de radiación podría condicionar la respuesta a la dormición. En el caso de las altas temperaturas se ha demostrado que este factor afecta el nivel de dormición durante la última parte del llenado de grano (27 a 46 dda) no durante la primera etapa del periodo de llenado de grano (13 a 26 dda; Bodrone *et al.*, 2017). De comprobarse que el efecto de la radiación sobre la dormición se circunscribe a la ventana de análisis evaluada en esta tesis pondría en evidencia que estos dos factores del ambiente actuarían sobre diferentes procesos que regulan el nivel de dormición de los frutos de girasol. En el caso de las altas temperaturas se ha demostrado que este factor afecta el nivel de dormición durante la última parte del llenado de grano y no durante la primera etapa del periodo de llenado de grano (desde los 13 hasta los 26 días desde antesis; Bodrone *et al.*, 2017). De comprobarse que el efecto de la radiación sobre la dormición se circunscribe a la ventana de análisis

evaluada en esta tesis pondría en evidencia que estos dos factores actuarían sobre diferentes procesos que condicionan el nivel de dormición de los frutos de girasol.

La realización de los experimentos de germinación de frutos de girasol (Figuras 2.7 a y 2.8, incubados a 25 y 12°C, respectivamente) y la realización de los test de partes (i.e. cipselas y semillas) de los distintos tratamientos de sombreado y sus controles han servido para demostrar que, una merma en la cantidad de radiación incidente durante el período de desarrollo y crecimiento del pericarpio modificó la dinámica de salida de la dormición de los frutos debido principalmente a cambios en la dormición impuesta por las cubiertas del fruto y, en mucha menor medida a cambios en la dormición embrionaria. El hecho de que las diferencias en la dinámica de la salida de la dormición se hayan expresado cuando las cipselas se incubaron a 25°C (Figura 2.7 a) y no a 12°C (Figura 2.8) y el alto porcentaje de germinación de las semillas a los 30 días después de la cosecha (Figuras 2.9 y 2.10) sugieren que la radiación afectaría la dormición impuesta por las cubiertas de los frutos. Si bien, el fotoperíodo no afectó el PG de las semillas y de las cipselas que crecieron bajo los dos regímenes fotoperíodos evaluados, la dormición que es atribuible al embrión y a las cubiertas del fruto difirió según la condición fotoperiódica a la que estuvieron expuestas las cipselas durante el período de llenado de grano. La dormición embrionaria explicó el porcentaje total de la dormición de las cipselas expuestas a fotoperíodos cortos, mientras que la dormición impuesta por las cubiertas y la dormición embrionaria explicaron en proporciones aproximadamente similares la dormición de las cipselas que crecieron bajo fotoperíodos largos (Figura 3.3 a). Estos resultados nos permiten aceptar parcialmente la hipótesis asociada al *objetivo 3 a* que dice que “el fotoperíodo y el nivel de radiación explorado por los frutos de girasol durante su crecimiento y maduración afectan el nivel de dormición a través de modificaciones en la dormición impuesta por las cubiertas”.

La variación del espesor de pericarpio en respuesta a la cantidad de la radiación incidente (Figura 2.12 y 2.23) a la que están expuestos los frutos de girasol, desde la última etapa de división celular de las paredes del ovario hasta que el pericarpio alcanza su máximo peso seco y finaliza la deposición de la pared secundaria, fue consistente con los resultados hallados para esta especie por Lindström *et al.* (2007). El hecho de que la

dormición impuesta por las cubiertas (Figuras 2.9 y 2.10) y el espesor del pericarpio (Figuras 2.12 y 2.14) hayan disminuido en respuesta a una menor cantidad de radiación incidente durante el período de crecimiento de las cubiertas del fruto, sugiere que el espesor del pericarpio estaría regulando, al menos en parte, la dormición impuesta por las cubiertas en el fruto de girasol. Sin embargo, las diferencias en el espesor del pericarpio (Figura 3.5) de los granos que crecieron bajo un diferente régimen fotoperiódico durante el período de grano no se correlacionaron con un diferente porcentaje de germinación (Figuras 3.2 y 3.3). El análisis de regresión entre el número de días necesarios para alcanzar un porcentaje de germinación del 50% y el espesor del pericarpio de los experimentos presentados en los Capítulos 2 y 3 (Figura 4.1), sugieren que los cambios en el espesor del pericarpio no modificarían “*per se*” la dormición impuesta por las cubiertas del fruto. La asociación entre ambas variables no fue significativa ( $p < 0.12$ ), solo el 24% de la variancia no error del  $PG_{50}$  fue explicado por el espesor del pericarpio (Tabla 4.3). En contraposición, y a pesar que existe evidencia preliminar que indica que la membrana seminal representa una restricción adicional para la germinación del embrión (Bodrone *et al.*, 2017), el grosor de esta membrana fue similar entre los controles y los tratamientos de restricción de radiación y sombreado y fotoperíodo. En base a estos se rechazó la hipótesis asociada al *objetivo 3 b* que dice que “el fotoperíodo y el nivel de radiación explorado por los frutos de girasol durante su crecimiento y maduración afectan el nivel de dormición de éstos a cosecha a través de modificaciones en la estructura física de las cubiertas del fruto (i.e. morfología del pericarpio y de la membrana seminal)”. Estos resultados sugieren que los cambios en el nivel de dormición impuesto por las cubiertas podrían estar asociados a otras características de las cubiertas, como por ejemplo, su composición química. En este sentido se sabe que las cubiertas de los frutos de girasol tienen en su composición química ceras y compuestos fenólicos que varían por efecto del ambiente. Por otra parte, en la bibliografía existe gran cantidad de evidencia que muestra la asociación entre la concentración de estos compuestos presentes en las cubiertas seminales y su posible asociación con el nivel de dormición (Penfield y MacGregor; 2017). Así, por ejemplo, Dorne (1981) demostró que las semillas de *Chenopodium bonus-henricus* que crecen en ambientes con alta radiación y baja temperatura presentaron un mayor contenido de polifenoles y un mayor nivel de dormición que las que se cultivaron en ambientes con baja radiación y alta temperatura.

Adicionalmente, en otras especies se ha documentado la existencia de una asociación significativa y positiva entre el contenido de taninos (*Arabidopsis thaliana*, Chen *et al.*, 2014) y de mucilagos (*Capsella bursa pastoris*; Toorop *et al.*, 2012) y la dormición.

El contenido de ABA juega un rol importante en la imposición de la dormición durante el desarrollo de las semillas (Jacobsen *et al.*, 2002; Feurtado y Kermode, 2007; Andrade *et al.*, 2015 y Roselló *et al.*, 2016), mientras que el mantenimiento/ salida de la dormición a menudo está asociado a cambios en la sensibilidad de embrión (Hilhorst *et al.*, 1986; Le Page-Degivry y Garello, 1992) y/o la síntesis *de novo* de esta hormona durante la imbibición (Jacobsen *et al.*, 2002; Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006). La asociación significativa y positiva entre el número de días necesarios para lograr un 50% de germinación y el contenido de ABA puso en evidencia que esta hormona está involucrada al menos en parte en la regulación del control de la dormición en respuesta al sombreado (Figura 4.2). Le Page-Degivry *et al.* (1990) sugirieron que la imposición de la dormición en embriones de girasol está determinada por un pico en el contenido de ABA durante las primeras etapas del desarrollo del fruto (desde el séptimo hasta el día 21 después de la polinización), coincidentemente con la ventana de tiempo en la que se aplicaron los tratamientos de sombreado, salvo el tratamiento que se aplicó antes de anthesis (R3<sub>12d</sub>). En contraposición, la diferencia tan notoria entre el PG<sub>50</sub> de los tratamientos de sombreado y de fotoperíodo, pero con un similar contenido de ABA sugiere que el contenido de ABA no explicaría toda la variación observada en el nivel de dormición. Tampoco se detectaron diferencias en la sensibilidad al ABA en ambos grupos de experimentos (Figuras 2.16 y 3.9 experimentos de sombreado y fotoperíodo respectivamente). La falta de sensibilidad al ABA de los frutos cultivados bajo los dos regímenes fotoperiódicos ensayados podría explicar, al menos en parte, la ausencia de diferencias en el PG de ambos tratamientos de fotoperíodo, como así también, los altos niveles de PG que presentaron ambos tratamientos a los pocos días de la cosecha. Por todo lo expuesto precedentemente los datos no nos permiten corroborar la hipótesis asociada al *objetivo 3 c* que dice que “el fotoperíodo y el nivel de radiación explorado durante el crecimiento y maduración de los frutos afecta la sensibilidad de los frutos al ABA y/o en el contenido endógeno de ABA de los embriones, en comparación con lo observado en frutos expuestos a condiciones naturales de fotoperíodo y

de radiación para la latitud en la cual se realizaron los experimentos”. Adicionalmente, el hecho de que el porcentaje de germinación no varió debido al agregado de inhibidores de las GAs y de etileno al medio de incubación evidenció que estas dos hormonas no estarían implicadas en la salida de la dormición de los frutos sometidos a diferentes tratamientos de sombreo. La importancia de estas hormonas en la regulación de la dormición tanto en embriones como en frutos de girasol ha sido descrita en la bibliografía (Le Page-Degivry *et al.*, 1996; Corbineau *et al.*, 1990). Le Page-Degivry *et al.* (1990) y Seiler (1998) demostraron que la adición exógena de GAs<sub>3</sub> al medio de incubación aumentó la germinación de frutos dormidos de girasol. Sin embargo, un aumento en la concentración de esta hormona no es una condición suficiente para que se produzca la salida de la dormición. En este sentido, Steinbach *et al.* (1997) y Benech-Arnold *et al.* (1999) demostraron que la dormición en semillas de sorgo es consecuencia de un balance entre el contenido endógeno de ABA y GAs. Se postula que la dormición de frutos de girasol que crecieron bajo diferentes regímenes de radiación podría estar asociada a un balance entre el contenido endógeno de ABA y de GAs. Matilla (2000) sugiere que el etileno tendría un rol en la inducción del catabolismo de ABA y también en cambios en la permeabilidad de las cubiertas seminales al ABA. También se deberían tener en cuenta la acción de otras hormonas (i.e. los jasmonatos y sus derivados, el ácido salicílico, las citoquininas, entre otras) y su interacción con las vías de señalización que regulan la imposición / salida de la dormición (Andrade *et al.* 2015; Roselló *et al.*, 2016y Penfield y MacGregor, 2017). A pesar de lo anteriormente expuesto, es necesario realizar experimentos complementarios para confirmar o descartar el posible rol de la sensibilidad al ABA y de la síntesis de ABA *de novo* durante la incubación de frutos de girasol.

### **4.3. CONCLUSIONES GENERALES**

Los resultados presentados en este trabajo generaron información sobre los efectos del ambiente (i.e. radiación y fotoperíodo) en la imposición del nivel de dormición en frutos de girasol. Además, se estudió la asociación entre los cambios observados con la morfología de las cubiertas seminales (i.e. pericarpio y membrana seminal) y la respuesta a

las principales hormonas involucradas en la imposición y mantenimiento de la dormición. Las investigaciones realizadas en esta tesis permitieron:

i) Demostrar que la radiación incidente experimentada por los frutos durante su desarrollo y maduración en la planta madre afecta la tasa de salida de la dormición en post-cosecha. Estos resultados pusieron en evidencia por primera vez, que la variación en la oferta de radiación incidente, además de la temperatura, podría explicar las variaciones en el nivel de dormición observados en esta especie ante cambios en la fecha de siembra.

ii) Identificar por primera vez, que la variación en la oferta de la radiación a causa de los efectos del sombreado, afectaría el nivel de dormición de los frutos de girasol debido a una menor actividad de la fuente.

iii) Demostrar que la variación en la oferta de radiación modifica la dormición impuesta por las cubiertas de los frutos, pero que esta variación no parecería estar mediada por un efecto sobre el grosor de las cubiertas del fruto.

iv) Proveer evidencias de que el contenido de ABA y no la sensibilidad al ABA está involucrado en la imposición de la dormición debido a la variación en la oferta de radiación.

Las posibles aplicaciones técnico-agronómicas que se derivan de esta investigación son:

Proveer información sobre las condiciones del ambiente en las que debería transcurrir el período de llenado grano para disminuir el nivel de dormición con el objetivo de producir semillas de girasol con bajos niveles de dormición. El hecho de que una menor oferta de radiación sobre el canopeo disminuye el nivel de dormición sugiere que los factores abióticos [i.e. disponibilidad hídrica, nutrición; (Roach y Wulf, 1987; Gul y Weber, 1998; Iuchi *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2020b y Kendall *et al.*, 2011)] y de manejo [i.e. fechas de siembra tardías (Bodrone *et al.*, 2017 y Riveira Rubin *et al.*, 2018)] que afectan la actividad de la fuente podrían disminuir el nivel de dormición de los frutos de

girasol. Sin embargo, en este punto es importante destacar que todas las condiciones citadas previamente van a repercutir negativamente sobre el rendimiento por unidad de superficie, y probablemente sobre el calibre de la semilla. En este caso particular y para las líneas que presenten este problema será necesario encontrar un punto de compromiso entre la reducción del nivel de dormición, del rendimiento y el calibre de los frutos.

Finalmente, este trabajo servirá como punto de partida para realizar futuras investigaciones conducentes a avanzar:

i) Estudios destinados a comparar los efectos de la radiación incidente durante la etapa de desarrollo y crecimiento del pericarpio y la etapa media y final de crecimiento efectivo del grano. Dado que en esta tesis se demostró que la tasa de crecimiento del cultivo afecta el nivel de dormición, la duración del área foliar en post-antesis debe ser incorporada como otra variable adicional a las anteriormente citadas.

ii) Estudios destinados a evaluar el efecto conjunto de ambos factores (i.e. temperatura y radiación) sobre el nivel de dormición. Es importante analizar si los efectos de ambos factores son aditivos, o lo que es más probable que existan interacciones entre ambos factores.

iii) Es necesario realizar nuevos experimentos para descartar/confirmar el posible rol del ABA (i.e. sensibilidad al ABA y síntesis de ABA *de novo*) en la imposición de la dormición de frutos de girasol ante cambios en la cantidad de radiación incidente durante el período de crecimiento y desarrollo de los frutos.

## BIBLIOGRAFIA

- Ali-Rachedi S., Bouinot D., Wagner M. H., Bonnet M., Sotta B., Grappin P. y Jullien M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219: 479-488.
- Allen P. S., Benech-Arnold R. L., Batlla D. y Bradford K. J. 2007. Modeling of seed dormancy. Pp. 72-112 en Bradford K. J. y Nonogaki H. (Eds.). *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Andrade A., Riera N., Lindström L., Alemano S., Alvarez D., Abdala G. y Vigliocco, A. 2015. Pericarp anatomy and hormone profiles of cypselas in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. *Plant Biology*, 17: 351-360.
- Andrianasolo F. N., Casadebaig P., Maza E., Champolivier L., Maury P., y Debaeke P. 2014. Prediction of sunflower grain oil concentration as a function of variety, crop management and environment using statistical models. *European Journal of Agronomy*, 54: 84-96.
- Bagniol S. 1987. Mise en évidence de l'intervention de l'éthylène dans la germination et la dormance des semences de tournesol (*Helianthus annuus L.*). Diplôme d'Études Approfondies. Université Pierre et Marie Curie, Paris, Francia.
- Baskin C. C. y Baskin J. M. 1998. *Seed Dormancy and Germination: Ecology, Biogeography and Evolution*. (Academic Press: San Diego).
- Batlla D. y Benech-Arnold R. L. 2004. Seed dormancy loss assessed by changes in population hydrotime parameters. Development of a predictive model. *Seed Science Research*, 14: 277-286.
- Bello I. A., Owen M. D. y Hatterman-Valenti H. M. 1995. Effect of shade on velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) growth, seed production, and dormancy. *Weed Technology*, 9: 452-455.
- Benech-Arnold R. L., Fenner M. y Edwards P. J. 1991. Changes in germinability, ABA levels and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* induced by water stress during grain filling. *New Phytologist*, 118: 339-347.
- Benech-Arnold R. L. y Sánchez R. A. 1995. Modelling weed seed germination. Pp. 545-566 en Kigel J. y Galili G. (Eds.). *Seed development and germination*. Marcel Dekker Inc: New York.
- Benech-Arnold R. L., Giallorenzi M. C., Frank J. y Rodríguez M. 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. L., Sánchez R. A., Forcella F., Kruk B., y 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. Pp. 169-198 en

- Benech-Arnold R. L. y Sánchez R. A. (Eds.). Handbook of Seed Physiology: applications to agriculture. Food Product Press, New York.
- Bewley J. D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.
  - Bewley, J. D. y Black M. 1994. Dormancy and the control of germination. Pp. 199-271 en Bewley J. D. y Black M. (Eds.). *Seeds. Physiology of development and germination*. 2° ed. Plenum Press, New York.
  - Bianco J., Garello G., y Le Page-Degivry M. T. 1994. Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. *Seed Science Research*, 4: 57-62.
  - Bianco J., Garello G. y Le Page-Degivry M. T. 1997. *De novo* ABA synthesis and expression of seed dormancy in a gymnosperm: *Pseudotsuga menziesii*. *Plant Growth Regulation*, 21: 115-119.
  - Bodrone M. P., Rodríguez M. V., Arisnabarreta S. y Batlla D. 2017. Maternal environment and dormancy in sunflower: the effect of temperature during fruit development. *European Journal of Agronomy*, 82: 93-103.
  - Brainard D. C., Bellinder R. R. y DiTomasso A. 2005. Effects of canopy shade on the morphology, phenology, and seeds characteristics of Powell Amaranth (*Amaranthus powellii*). *Weed Science*, 53: 175-186.
  - Cantagallo J. E., Chimenti C. A. y Hall A. J. 1997 Number of seeds per unit area in sunflower correlates well with a photothermal quotient. *Crop Science*, 37: 1780-1786.
  - Cantagallo J. E., Medan D. y Hall A. J. 2004 Grain number in sunflower as affected by shading during floret growth, anthesis and grain setting. *Field Crops Research*, 85: 191-202.
  - Ceccato D., Bertero D. y 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.
  - Ceccato D., Bertero D., Batlla D. y Galati B. 2015. Structural aspects of dormancy in quinoa (*Chenopodium quinoa*): importance and possible action mechanisms of the seed coat. *Seed Science Research*, 25: 267-275.
  - Chen M., MacGregor D. R., Dave A., Florance H., Moore K., Paszkiewicz K., Smirnoff N., Graham I. A. y Penfield S. 2014. Maternal temperature history activates Flowering Locus T in fruits to control progeny dormancy according to time of year. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111: 18787-18792.
  - Chimenti C. A. y Hall A. J. 2001. Grain number responses to temperature during floret differentiation in sunflower. *Field Crops Research*, 72: 177-184.
  - Contreras S., Bennett M. A., Metzger J. D. y Tay D. 2008. Maternal light environment during seed development affects lettuce seed weight, germinability, and storability. *Hortscience*, 43: 845-852.
  - Corbineau F. y Côme D. 1987. Regulation de las semillas de tournesol par l'éthylène. Volume 1 Pp. 271-282 en: *Annales ANPP*, 2ème Colloque sur les substances de

croissance et leurs utilisations en agriculture. Association Nationale de Protection des Plantes, Paris.

- Corbineau F. 1987. La germination des semences de tournesol et sa regulation par l'éthylene. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 266: 477-479.
- Corbineau F., Rudnicki R.M., y Côme 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. y Côme D. 1990. Sunflower (*Helianthus annuus L.*) seed dormancy and its regulation by ethylene. *Israel Journal of Botany*, 39: 313-325.
- de la Vega A. J. y Hall A. J. 2002. Effects of planting date, genotype and their interactions on sunflower yield: II components of oil yield. *Crop Science*, 42: 1201-1210.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo, C. W. 2012 InfoStat, in: G. InfoStat (Ed.), FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dorne A. J. 1981. Variation in seed germination inhibition of *Chenopodium bonushenricus* in relation to altitude of plant growth. *Canadian Journal of Botany*, 59: 1893-1901.
- Fenner M. 1991. The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Science Research*, 1: 75-84.
- Feurtado A. y Kermode A. 2007. A merging of paths: abscisic acid and hormonal cross-talk in the control of seed dormancy maintenance and alleviation. Pp. 176-223 en Bradford K. J. y Nonogaki H. (Eds.). *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Finch-Savage W. E. y Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501-523.
- Finkelstein R. R., Gampala S. S. L. y Rock C. D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14: S15-S45.
- Fonseca A. E. y Sánchez R. A. 2000. Efecto de la temperatura durante el llenado de grano sobre la germinación de semillas de girasol (*Heliantus annus L.*). Pp. 216-217 en Resúmenes de la XXIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Asociación Argentina de Fisiología Vegetal, 27 al 30 de noviembre, Córdoba.
- Gandhi S., Heesacker A. F., Freeman C. A., Argyris J., Bradford K. y Knapp S. J. 2005. The self-incompatibility locus (S) and quantitative trait loci for self-pollination and seed dormancy in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 619-629.
- Gallagher R. S., Granger K. L., Snyder A. M., Pittmann D. y Fuerts E. P. 2013. Implications of environmental stress during seed development on reproductive and seed bank persistence traits in Wild oat (*Avena fatua L.*). *Agronomy*, 3: 537-549.
- Gul B. y Weber D. J. 1998. Effect of dormancy-relieving compounds on the seed germination of non-dormant *Allenrolfea occidentalis* under salinity stress. *Annals of Botany*, 82: 555-560.

- Gutterman Y. 2000. Maternal effects on seeds during development. Pp. 59-86, en Fenner, M. (Ed.). Seeds, the ecology of regeneration in plant communities. C.A.B. International, Melksham.
- Gutterman Y. 1978. Germinability of seeds as a function of the maternal environments. *Acta Horticulturae*, 83: 49-55.
- Gutterman Y. 1973. Differences in progeny due to day-length and hormone treatment of the mother plant. Pp. 59-80 en Heydecker W. (Ed.). Seed ecology. Butterworth, London.
- Gutterman Y. 1974. The influence of the photoperiodic regime and red-far red light treatments of *Portulaca oleracea* L. plants on the germinability of their seeds. *Oecologia*, 17: 27-38.
- Hall A. J., Connor D. J. y Whitfield D. M. 1989. Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water-stressed sunflower crops I. Estimates using labelled carbon. *Field Crops Research*, 20(2): 95-112.
- He H., Vidigal D. S., Snoek L. B., Schnabel S., Nijveen H., Hilhorst H. y Bentsink L. 2014. Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65: 6603-6615.
- Heide O. M., Junttila O. y Samuelsen R. T. 1976. Seed germination and bolting in red beet as affected by parent plant environment. *Physiologia Plantarum*, 36: 343-349.
- Hernández L. F. y Orioli G. A. 1994. El ideotipo del girasol (*Helianthus annuus* L.). *Agriscientia*, 11: 87-98.
- Hilhorst H. W. M. 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5: 61-73.
- Hilhorst H. W. M., Smitt I. y Karssen C. M. 1986. Gibberellin biosynthesis and sensitivity mediated stimulation of seed germination of *Sysimbrium officinale* by red light and nitrate. *Physiologia Plantarum*, 67: 285-290.
- Hu X. W., Huang X. H. y Wang, Y. R. 2012. Hormonal and temperature regulation of seed dormancy and germination in *Leymus chinensis*. *Plant Growth Regulation*, 67: 199-207.
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase: a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 27: 325-333.
- Imaizumi T., Auge G. y Donohue K. 2017. Photoperiod throughout the maternal life cycle, not photoperiod during seed imbibition, influences germination in *Arabidopsis thaliana*. *American Journal of Botany*, 104: 516-526.
- Izquierdo N. G., Aguirrezábal L. A. N., Andrade F. H., Geroudet C., Valentinuz O. y Pereyra Iraola M. (2009) Intercepted solar radiation affects oil fatty acid composition in crop species. *Field Crops Research*, 114: 66-74.

- Jacobsen J. V., Pearce D. W., Poole A. T., Pharis R. P. y Mander L. N. 2002. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiologia Plantarum*, 115: 428-441.
- Jandel-Scientific, 1992. Table Curve V 3.0. User's Manual Version 3.0 AISN Software. Jandel-Scientific, Corte Madera, CA.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Khan I.U., Ali A., Khan H. A., Baek D., Park J., Lim C. J., Zareen S., Jan M., Lee S. Y. y Pardo J. M. 2020. PWR/HDA9/ABI4 complex epigenetically regulates ABA dependent drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 11: 623.
- Khan N., Bano A., Ali S. y Babar M. A. 2020. Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 90: 189-203.
- 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. y Laçka E. 1986. A revision of the hormone-balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. Pp. 315-323 en Bopp M. (Ed.). *Plant growth substances 1985*. Heidelberg, Springer. Karssen C. M., Zagorski S., Kepczynski J. y Groot S. P. C. 1989. Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany*, 63: 71-80.
- Kendall S. L., Hellwege A., Marriot P., Whalley C., Graham I. A. y Penfield S. 2011. Induction of dormancy in *Arabidopsis* summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. *Plant Cell*, 23: 2568-2580.
- Kepczynski J. y Kepczynska E. 1997. Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiologia Plantarum*, 101: 720-726.
- Kigel J., Gibly A. y Negbi M. 1979. Seed germination in *Amaranthus retroflexus* L. as affected by the photoperiod and age during flower induction of the parent plants. *Journal of Experimental Botany*, 30: 997-1002.
- Lachabrouilli A.-S., Rigal K., Corbineau F. y Bailly C. 2021. Effects of agroclimatic conditions on sunflower seed dormancy at harvest. *European Journal of Agronomy*, 124: 126209.
- Le Page-Degivry M. T., Bianco J., Barthe P., y Garello G. 1996. Changes in hormone sensitivity in relation to onset and breaking of sunflower embryo dormancy. Pp. 221-231 en Lang G. A. (Ed.). *Plant dormancy. Physiology, biochemistry and molecular biology*. CAB International.
- Le Page-Degivry M. T., Barthe P. y 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. y Garello G. 1992. In situ abscisic acid synthesis. *Plant Physiology*, 98: 1386-1390.
- Léon-Kloosterziel K. M., Keijzer, C. J. y Koornneef, M. 1994. A seed shape mutant of *Arabidopsis* that is affected in integument development. *Plant Cell*, 6: 385-392.
- Lindström L. I., Pellegrini C. N., y Hernández, L.F. 2000. Anatomía y desarrollo del pericarpio de distintos genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L.). In The 15th International Sunflower Conference, Proceedings, Toulouse, France, D13-D18.
- Lindström L. I., Pellegrini C. N., Aguirrezabal L. y Hernandez L. F. 2006. Growth and development of sunflower fruits under shade during pre and early post-anthesis period. *Field Crops Research*, 96: 151-159.
- Lindström L. I., Pellegrini C. N. y Hernández L. F. 2007. Histological development of the sunflower fruit pericarp as affected by pre- and early post-anthesis canopy shading. *Field Crops Research*, 103: 229-238.
- Little T. M. y Hills F. J. 1975. *Statistical methods in agricultural research*. University of California Press, Davis.
- MacGregor D. R., Kendall S. L., Florance H., Paszkiewicz K., Smirnoff N. y Penfield S. 2015. Seed production temperature regulation of primary dormancy occurs through control of seed coat phenylpropanoid metabolism. *The New Phytologist*, 205: 642-652.
- Mantese A. J., Medan D. y Hall A. J. 2006. Achene structure, development and lipid accumulation in sunflower cultivars differing in oil content at maturity. *Annals of Botany*, 97: 999-1010.
- Marzinek J., De-Paula O. C. y Oliveira D. M. T. 2008. Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. *Revista Brasileira de Botânica*, 31: 549-553.
- Matilla A. J. 2000. Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research*, 10: 111-126.
- Mayer L. I. 2015. El estrés térmico post-floración y sus efectos sobre el peso y la calidad de los granos en maíces de diferente destino de producción. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Agropecuarias
- Oreja F. H. 2014. Factores ambientales pre - dispersión y post - dispersión de semillas que modulan la germinación y emergencia de *Digitaria sanguinalis* [L.] Scop. en el cultivo de soja. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Agropecuarias
- Penfield S. y MacGregor D. R. 2017. Effects of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany*, 68: 819-825.
- Ploschuk E. L. y Hall A. J. 1995. Capitulum position in sunflower affects grain temperature and duration of grain filling. *Field Crops Research*, 44: 111-117.

- Presotto M., Poverene M. y Catamutto M. 2014. Seed dormancy and hybridization effect of the invasive species, *Helianthus annuus*. *Annals of Applied Biology*, 164: 373-383.
- Rademacher W. 2000 Growth retardants: effects on gibberellin bio-synthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 501-531.
- Riveira Rubin M., Goodal J., Woodgate J. M., Arata G. J., Rodríguez M.V. y Batlla D. 2018. Efecto de la fecha de siembra sobre el nivel de dormición en frutos de girasol: Estudios de los mecanismos fisiológicos. XXXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Córdoba, Argentina.
- Roach D. A. y Wulf R. D. 1987. Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 209-235.
- Rodríguez M. V.; Rondanini D., Libenson S. y 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. San Luis, Argentina. *Boletín de la SAB* 38: 195.
- Rodriguez M. V., Margineda M.; González Martín J. F., Insausti P. y Benech-Arnold R. L. 2001. Predicting Preharvest Sprouting Susceptibility in Barley: A Model Based on Temperature during Grain Filling. *Agronomy Journal*, 93: 1071-1079.
- Rolletschek H., Borisjuk L., Sánchez-García A., Gotor C., Romero L. C., Martínez-Rivas, J. M. y Mancha M. 2007. Temperature- dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany*, 12: 3171-3181.
- Rondanini D., Mantese A. J., Savin R. y Hall A. J. 2006. Responses of sunflower yield and grain quality to alternating day/night high temperature regimes during grain filling: Effects of timing, duration and intensity of exposure to stress. *Field Crops Research*, 96: 48-62.
- Roselló P. L., Vigliocco A. E., Andrade A. M., Riera N. V., Calafat M., Molas M. L. y Alemano S. G. 2016. Differential hormonal and gene expression dynamics in two inbred sunflower lines with contrasting dormancy level. *Plant Physiology and Biochemistry*, 102: 133-140.
- Sánchez R. A., Eyherabide G. y de Miguel L. 1981. The influence of irradiance and water deficit during fruit development on seed dormancy in *Datura ferox* L. *Weed Research*, 21: 127-132.
- Saranga Y., Sass N., Tal Y. y Yucha R. 1998. Drought conditions induce mote formation in interspecific cotton hybrids. *Field Crops Research*, 55: 225-234.
- Schneider A. y Miller, J. 1981. Description of Sunflower Growth Stages. *Crop Science*, 21: 901-903.
- Schuurink R. C., Van Beckum J. M. M. y Heidekamp F. 1992. Modulation of grain dormancy in barley by variation of plant growth conditions. *Hereditas*, 117: 137- 143.

- 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.
- Steckel L. E., Sprague C. L., Hager A. G., Simmons, F. W. y Bollero G. A. 2003. Effects of shading on common waterhemp (*Amaranthus rudis*) growth and development. *Weed Science*, 51: 898-903.
- Steinbach H. S., Benech-Arnold R. L., Kristof G., Sánchez R. A. y Marcucci-Poltri S. 1995. Physiological basis of pre-harvest sprouting resistance in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. ABA levels and sensitivity in developing embryos of sprouting-resistant and -susceptible varieties. *Journal of Experimental Botany*, 46: 701-709.
- Steinbach H. S., Benech-Arnold R. L. y Sánchez R. A. 1997. Hormonal regulation of dormancy in developing *Sorghum* seeds. *Plant Physiology*, 113: 149-154.
- Stoller E. W. y Myers R. A. 1989. Effects of shading and soybean *Glycine max* (L.) interference on *Solanum ptycanthum* (Dun.) (eastern black nightshade) growth and development. *Weed Research*, 29: 307-316.
- Vigliocco A.E., Andrade A. M., Lindström L. I., y Alemano S. G. 2017. Dormancy in sunflower line A-3: The role of the pericarp. *Botany*, 95: 853-858.
- Toorop P. E., Cuerva R. C., Begg G. S., Locardi B., Squire G. R. y Iannetta P. P. 2012. Co-adaptation of seed dormancy and flowering time in the arable weed *Capsella bursa-pastoris* (shepherd's purse). *Annals of Botany*, 109(2): 481-489.
- Young, H. M., Sheeja G., Narváez D. F., Srivastava P., Shuerger A. C., Wright D. L. y Marois, J. J. 2012. Effect of solar radiation on severity of *soybean rust*. *Phytopatology*, 102: 794-803.