

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

**TRABAJO FINAL PRESENTADO PARA OPTAR AL  
GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**JASMONATOS ENDÓGENOS Y SU RELACIÓN CON LA DORMICIÓN DE  
SEMILLAS DE DOS LÍNEAS ENDOCRIADAS DE GIRASOL  
(*Helianthus annuus* L.)**

**ALUMNO: JULIÁN ANSELMO BOHANO  
DNI: 29.587.384**

**DIRECTORA: DRA. ANDREA M. ANDRADE  
CO-DIRECTORA: DRA. ANA VIGLIOCCO**

**RÍO CUARTO, CÓRDOBA, ARGENTINA  
Marzo 2012**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN**

**Jasmonatos endógenos y su relación con la dormición de semillas de dos líneas endocriadas de girasol (*Helianthus annuus* L.)**

Autor: Julián Anselmo Bohano

DNI: 29.587.384

Directora: Dra. Andrea M. Andrade

Co-directora: Dra. Ana E. Vigliocco

Aprobado y corregido de acuerdo a las sugerencias del Jurado Evaluador:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Fecha de Presentación: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Aprobado por la Secretaría Académica: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Secretario Académico

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	VI
<b>SUMMARY</b> .....	VII
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
- Descripción del material vegetal.....	1
- Germinación y dormición del girasol.....	2
- Hormonas involucradas en germinación y dormición.....	3
- Biosíntesis y catabolismo de ácido jasmónico.....	4
- Rol fisiológico de Jasmonatos.....	6
- Hipótesis.....	7
- Objetivo general.....	7
- Objetivos específicos.....	7
<b>MATERIALES, TÉCNICAS Y MÉTODOS</b> .....	8
- Material vegetal.....	8
- Evaluación del porcentaje de germinación.....	8
- Obtención de embrión y pericarpo.....	8
- Extracción, purificación y cuantificación de JAs.....	8
- Reproducibilidad de las determinaciones.....	9
- Análisis estadístico.....	9
<b>RESULTADOS</b> .....	11
- Evaluación de poder germinativo.....	11
- Contenido endógeno de JAs en pericarpo de semillas secas.....	12
- Contenido endógeno de JAs en embrión de semillas secas.....	14
- Analisis de correlacion entre porcentaje de germinacion y niveles hormonales endógenos...	16
<b>DISCUCIÓN</b> .....	18
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	21
<b>BIBLIOGRAFIA CITADA</b> .....	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCION</b>	
<b>Fig. 1.</b> Área de siembra del girasol en Argentina.....	1
<b>Fig. 2.</b> Estructura química del ácido jasmónico.....	5
<b>Fig. 3.</b> Representación esquemática de la biosíntesis de ácido jasmónico .....	5
<b>RESULTADOS</b>	
<b>Fig. 4.</b> Evolución del porcentaje de germinación de semillas de las líneas B91 y B123 durante los diferentes tiempos post-cosecha .....	11

<b>Fig. 5.</b> Estructura química de los compuestos aislados e identificados en semillas de las líneas B91 y B123.....	12
<b>Fig. 6.</b> Niveles endógenos de JA en pericarpo de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha .....	12
<b>Fig. 7.</b> Niveles endógenos de JA-Ile en pericarpo de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha.....	13
<b>Fig. 8.</b> Niveles endógenos de 12-OH-JA en pericarpo de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha.....	14
<b>Fig. 9.</b> Niveles endógenos de JA en embrión de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha.....	15
<b>Fig. 10.</b> Niveles endógenos de JA-Ile en embrión de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha.....	15
<b>Fig. 11.</b> Niveles endógenos de 12-OH-JA en embrión de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha.....	16

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>RESULTADOS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de JA.....	16
<b>Tabla 2.</b> Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de JA-Ile.....	17

## RESUMEN

Los jasmonatos (JAs) están involucrados en diferentes procesos del desarrollo vegetal tales como embriogénesis y germinación, entre otros. El objetivo de este trabajo fue analizar los niveles endógenos de Jasmonatos en semillas secas de líneas endocriadas dormida (B123) y no dormida (B91), y correlacionarlos con su capacidad germinativa. Esta información fue correlacionada con la capacidad germinativa de ambas líneas. Veinticinco semillas se sembraron en bandejas de plástico entre toallas de papel humedecidas a saturación con agua destilada y se cubrieron con bolsas de nylon. El poder germinativo se determinó a los 10 días post-siembra. Como criterio de germinación se consideró la profusión de la radícula a través del pericarpo. El porcentaje de germinación y los niveles endógenos de JA, 12-OH-JA y JA-Ile se evaluaron a los 0, 11, 22, 33 y 44 días post-cosecha. Las hormonas antes mencionadas se identificaron y cuantificaron por LC/MS-MS en embrión y pericarpo de semillas secas. En embrión, JA no mostró diferencias entre ambas líneas y sus niveles fueron mayores a los 33 días post-cosecha, siendo este incremento más notorio en la línea B123. El contenido de 12-OH-JA fue fluctuante en ambas líneas durante todo el experimento. En pericarpo, el contenido de JA fue mayor en la línea B123 en todos los tiempos post-cosecha evaluados. Tanto en la línea B91 como B123, JA-Ile no varió significativamente entre los tiempos postcosecha analizados. El porcentaje de germinación no presentó diferencias significativas entre líneas a partir de los 33 días post-cosecha. Finalmente, los resultados obtenidos sugieren que JA estaría involucrado en la liberación de la dormición y por lo tanto podría inducir la germinación a través de la movilización de sustancias de reserva.

*Palabras claves:* *Helianthus annuus* L., Jasmonatos, dormición, tiempos post-cosecha, semilla.

## SUMMARY

The jasmonates (JAs) are involved in different developmental processes such as embryogenesis and germination, among others. The aim of this study was to analyze the jasmonates-endogenous levels in dry seeds of B123 (with dormancy at harvest) and B91 (without dormancy at harvest) sunflower line, and correlate with seed germination. This information was correlated with germination percentage. Twenty-five seeds were germinated between wet filter paper towels moistened with distilled water and covered with fine nylon bags. The germination was determined at 10 days after sowing. Germination was defined as the emergence of a clearly visible radicle. The germination percentage and JA, 12-OH-JA and JA-Ile endogenous levels were evaluated at 0, 11, 22, 33 and 44 post-harvest days. The hormones mentioned were identified and quantified by LC/MS-MS in embryo and pericarp of dry seeds. In embryo, JA did not show difference between both lines and its levels were higher at 33 post-harvest days. This increase was remarkable in B123 line. In both lines, 12-OH-JA content changed along the experiment. In B123 line, JA-pericarp content was high at all post-harvest times. JA-Ile showed no change in both B123 and B91 lines at different post-harvest times. At 33 days of post-harvest, no significant differences in germination percentage was observed between lines. Finally, these results suggest that JA is involved in dormancy release, and therefore could induce germination through the storage reserve mobilization.

*Key words:* *Helianthus annuus* L., Jasmonates, dormancy, post-harvest time, seed.

## INTRODUCCIÓN

Argentina, el este Europeo y la Unión Soviética son los principales centros de producción de girasol. Nuestro país se ha constituido en uno de los principales exportadores del mundo de granos de oleaginosas, aceites y harinas proteicas, representando el girasol un 27% de la producción total de cultivos oleaginosos. Es una especie que se adapta fácilmente a diferentes ambientes, y su importancia radica principalmente en la utilización para la extracción de aceite y sus residuos constituyen subproductos (Díaz-Zorita *et al.*, 2003).

En el hemisferio sur, Argentina es el país más destacado como productor de esta oleaginosa con 3,5/4,5 millones de toneladas anuales (ASAGIR, 2008), y su área potencialmente cultivable se extiende desde Chaco en el norte hasta el sur de la región pampeana (Díaz-Zorita *et al.*, 2003; MAGyP, 2011) (Fig.1). No obstante, en los últimos años este cultivo fue desplazado desde zonas de siembra tradicionales y con alto rendimiento hacia áreas marginales expuestas a condiciones ambientales adversas, donde la baja disponibilidad de agua es una situación frecuente (Andriani, 2004).

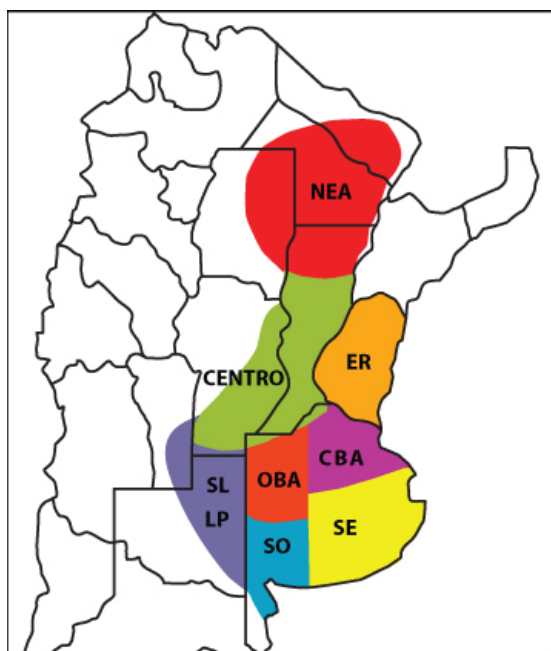


Fig. 1. Área de siembra del girasol en Argentina (ASAGIR, 2008)

### Descripción del material vegetal

El girasol pertenece a la familia *Asteraceae* y su nombre científico es *Helianthus annuus L.* En griego, *helios* significa sol y *anthos* flor; el nombre de la especie se refiere a la anualidad del ciclo vegetativo - reproductivo de la planta (Alba-Ordóñez y Llanos-Company, 1990).

Botánicamente el fruto es seco, indehisciente y se denomina cipsela. Está formado por el pericarpo y la semilla. A esta última se la denomina comúnmente “pepita”, y al pericarpo “cáscara”. Cabe señalar que en el lenguaje coloquial las cipselas son denominadas impropriamente “semillas”.

El pericarpo está compuesto por una serie de tejidos: la epidermis, formada por células epidérmicas con gruesas paredes externas recubiertas por una fina cutícula protectora; la hipodermis, localizada por debajo de la epidermis. Por debajo de la hipodermis se encuentra el estrato medio o tejido fibroso, que es el más fuertemente desarrollado y condiciona la dureza del pericarpo y por último el parénquima, la capa más interna de células.

Las partes constituyentes de la semilla son: la cubierta seminal, el endosperma y el embrión. La cubierta o tegumento seminal crece con el endosperma formando una fina película que separa el embrión de la semilla. El endosperma se reduce a una o dos capas de células de paredes gruesas. Los cotiledones representan la reserva principal de aceite de la semilla y están cubiertos en la parte superior e inferior por una capa de células epidérmicas (epidermis exterior e interior). En medio de cada cotiledón se ramifican las nervaduras procambiales, que representan las futuras nervaduras de la hoja. El mesófilo de los cotiledones está compuesto por tejido esponjoso y en empalizada. Finalmente, en el extremo más agudo de la semilla se encuentra la plúmula.

Externamente, la cipsela presenta estrías con matices marrón-ceniza o negro con fondo blanco o ceniza y su tamaño usualmente varía entre 6-25 mm de largo y 4-13 mm de ancho. Esta variación en tamaño y/o peso depende tanto de la especie así como del genotipo dentro de una especie determinada (en particular *Helianthus annuus* L.). Los principales factores no-genéticos que determinan el tamaño de la cipsela son: el tipo utilizado en la siembra, el número de plantas por unidad de superficie, la humedad del suelo y las condiciones edáficas (Giayetto, 1985).

### **Germinación y dormición del girasol**

Condiciones ambientales adversas, tales como sequía y salinidad, dificultan el crecimiento de las plantas y ocasionan importantes pérdidas de rendimiento en numerosos cultivos de importancia económica, entre ellos el girasol. En adición, a menudo este cultivo se ve afectado por la presencia de dormición. Tradicionalmente, la *dormición* ha sido definida como el estado del desarrollo en el cual una semilla intacta viable es incapaz de germinar bajo condiciones ambientales favorables (por ej., adecuada humedad). Sin embargo, actualmente se sostiene que la dormición no sólo está asociada con la ausencia de germinación, sino que es una característica de la semilla que determina las condiciones necesarias para su germinación (Thompson, 2000; Fenner y Thompson, 2005).



La dormición es un proceso complejo y difícil de comprender en el campo de la biología de semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Generalmente, se considera un rasgo adaptativo (Foley, 2001). A través de esta adaptación, la germinación se produce sólo cuando las condiciones son adecuadas para la germinación y establecimiento de plántulas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finch-Savage *et al.*, 2007). Más aún, esta condición es de vital importancia agronómica y ecológica ya que determina el grado de germinación sincrónica en una determinada estación así como el número de semillas viables no germinadas que permanecen en el suelo hasta la próxima estación de crecimiento, es decir, forman el banco de semillas (Finkelstein *et al.*, 2008).

El grado de dormición varía entre las diferentes especies vegetales y es regulado tanto por factores genéticos como ambientales (Li y Foley, 1997). En girasol, la dormición es un rasgo característico de las semillas al momento de su cosecha; esto es, a la madurez fisiológica alcanzan su grado máximo de dormición y luego frecuentemente la pierden durante el almacenamiento (Corbineau *et al.*, 1991). Cabe destacar además que en girasol la dormición se haya controlada por el embrión y la cubierta seminal (Kelly *et al.*, 1992). Así, aquella impuesta por la cubierta seminal actúa a través del efecto que ocasionan los compuestos fenólicos sobre la disponibilidad de oxígeno para el embrión y por lo tanto habitualmente se expresa a altas temperaturas. Por el contrario, el embrión está involucrado en la restricción de la germinación a temperaturas por debajo de 15 °C (Corbineau *et al.*, 1990; Gay *et al.*, 1991). A menudo, la dormición impuesta por el embrión comprende un corto período de tiempo (4 a 8 semanas), mientras que aquella inducida por la cubierta seminal y el pericarpo persiste generalmente por más de 32 semanas. Particularmente en girasol, año a año se han reportado diferencias en el grado de dormición del embrión (Le Page-Degivry *et al.*, 1990).

### **Hormonas involucradas en germinación y dormición**

Se considera que la semilla necesita un mecanismo para “interpretar” la información, proveniente tanto de señales internas como del medio, de manera dinámica para responder con plasticidad. Entre los compuestos involucrados en los mecanismos de transducción de estas señales se encuentran moléculas reguladoras del crecimiento u *hormonas*. En la literatura ha sido bien documentado que las fitohormonas u hormonas vegetales están involucradas en la germinación de las semillas, en particular Giberelinas (GAs) y Ácido abscísico (ABA). En este proceso, ambas hormonas ejercen efectos antagónicos: ABA inhibe la germinación mientras que GAs la promueven (Bewley, 1997; Finkelstein *et al.*, 2002; Kucera *et al.*, 2005). En tal sentido, el concepto clásico de balance hormonal sostiene que la inducción, mantenimiento y ruptura de la dormición son procesos regulados por la acción conjunta de ABA y GAs (Karssen y Lacka, 1986).

En adición a las auxinas, GAs, citocininas, ABA y etileno, otras hormonas vegetales fueron identificadas y caracterizadas en las dos últimas décadas, entre ellas los *jasmonatos* (JAs). El contenido endógeno de JAs varía dependiendo de la especie vegetal, el tejido y tipo celular, estadio ontogénico de la planta, y en respuesta a diferentes estímulos del medio ambiente (Creelman y Mullet, 1997).

### **Biosíntesis y catabolismo de ácido jasmónico**

Los JAs conforman un grupo de numerosos compuestos precursores o derivados del ácido jasmónico (JA) que ocurren naturalmente en el Reino Plantae, poseen actividad biológica, y por ser derivados de ácidos grasos poliinsaturados forman parte del grupo de oxilipinas. Las investigaciones realizadas sobre estos compuestos han estado focalizadas principalmente en la biosíntesis del grupo constituido por el JA y sus compuestos relacionados, denominados colectivamente JAs, así como también al papel que desempeñan en la regulación de numerosos procesos de las plantas. Estos compuestos han sido detectados gracias al perfeccionamiento de técnicas analíticas como cromatografía líquida-espectrometría de masa tándem (LC/MS-MS) (Abdala y Cenzano, 2006).

JA es el producto final de la vía octadecanoica, la cual tiene lugar en tres compartimentos celulares diferentes: cloroplasto, peroxisoma y citoplasma. En cloroplasto, la biosíntesis de JA se origina a partir del ácido graso poliinsaturado  $\alpha$ -ácido linolénico ( $\alpha$ -LA, 18:3) mediante la inserción de oxígeno molecular en el C13 catalizada por la enzima 13-lipoxigenasa (LOX), conduciendo a la formación del ácido 13 hidropéroxido-octadecatrienoico (13-HPOT), el cual es convertido por la acción de una óxido de aleno sintasa (AOS) a un óxido de aleno altamente inestable (ácido 12, 13-epoxi-octadecatrienoico). Este óxido de aleno en presencia de una óxido de aleno ciclasa (AOC) origina el ácido *cis*(+)-12-oxofitodienoico (OPDA), primer precursor cíclico de JA. La translocación de OPDA a peroxisoma, donde se produce la segunda mitad de la síntesis de JA, es mediada por un transportador ABC comatose. Una OPDA reductasa 3 (OPR3) cataliza la reducción de OPDA a ácido 3-oxo-pentenilo-ciclopentano-octanoico (OPC-8:0), el cual luego de tres ciclos de  $\beta$ -oxidación catalizados por una Acil-CoA oxidasa (ACX), proteínas multifunciones (MFP) y L-3-Ketoacil-CoA tiolasa (KAT) origina (+)-7-*iso*-ácido jasmónico (Fig. 2).



Fig. 2. Estructura química del ácido jasmónico

Este compuesto fisiológicamente activo es convertido rápidamente en su estereoisómero más estable, (-)JA, el cual posteriormente es metabolizado en el citoplasma dando origen a diferentes miembros de la familia de los JAs. Algunas de las modificaciones que sufre JA son: metilación en el C1 para producir Me-JA, hidroxilación en el C11 o C12 para formar 11-OH-JA o 12-OH-JA, glucosilación de los derivados hidroxilados mencionados, conjugación de JA o sus derivados hidroxilados con aminoácidos, o bien degradación del ácido carboxílico de la cadena lateral para formar *cis*-jasmone (Wasternack y Kombrink, 2010; Avanci *et al.*, 2010) (Fig. 3).

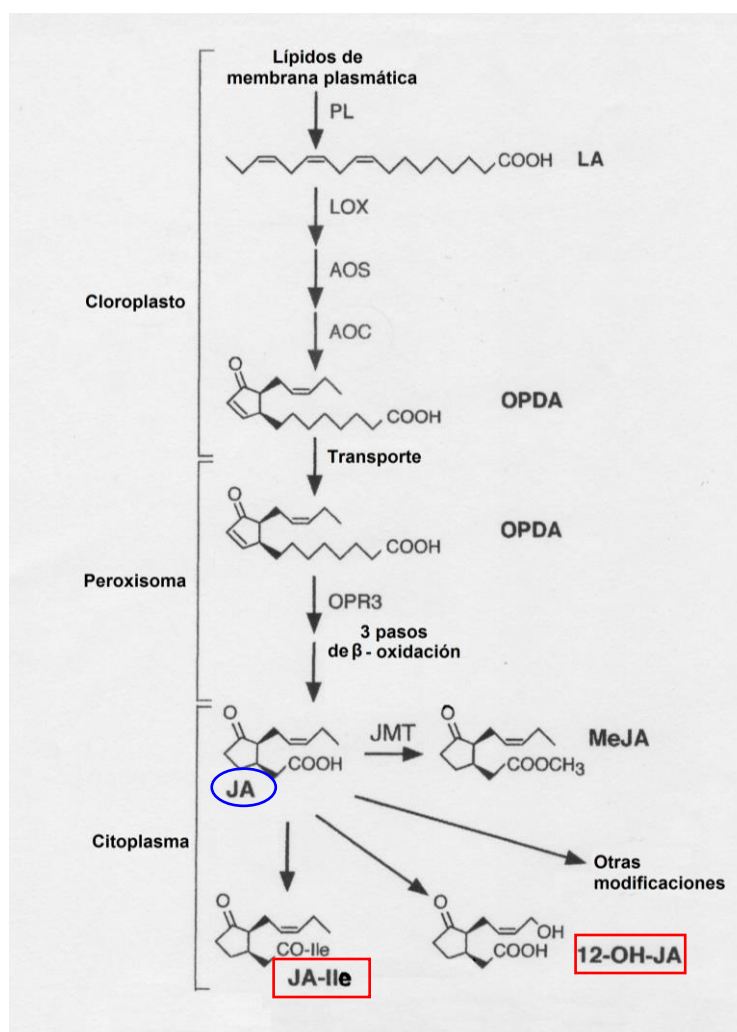


Fig. 3. Representación esquemática de la biosíntesis de ácido jasmónico (Adaptado de Pré, 2006)

## **Rol fisiológico de Jasmonatos**

Los JAs están involucrados en numerosos procesos celulares y regulan diversas etapas del desarrollo, como así también intervienen en las respuestas de las plantas a factores de estrés biótico y abiótico (Wasternack y Hause, 2002).

Entre los procesos del desarrollo modulados por JAs se encuentra la inhibición de la germinación (Wilén *et al.*, 1991; 1994) y del crecimiento radical (Berger, 2002), la estimulación del desarrollo floral (Creelman y Mullet, 1997) y del enrollamiento de los zarcillos (Blechert *et al.*, 1999), la dehiscencia de la antera y la maduración del polen (Mandaokar *et al.*, 2003), la inducción de la tuberización en papa (Abdala *et al.*, 2002), la maduración de frutos y la abscisión foliar (Parthier, 1991) y la promoción de la senescencia (Wasternack y Hause, 2002).

En relación a su implicancia en los procesos de germinación y/o dormición de semillas, los conocimientos actuales son insuficientes e incluso en ciertos casos contradictorios. Por ejemplo, tratamientos con JA o Me-JA inhibieron la germinación de diversas especies tales como lechuga (Yamane *et al.*, 1981), *Agrostemma* (Sembdner y Gross, 1986), girasol (Corbineau *et al.*, 1988) y *Amaranthus* (Kepczynski y Bialecka, 1994). Similarmente, en semillas no dormidas de abrojo se observó una significativa inhibición de la germinación luego de la aplicación 1 mM de Me-JA. Más aún, la tasa de germinación disminuyó con el incremento en la concentración aplicada, alcanzando valores cero a una concentración 1000 mM de Me-JA (Nojavan-Asghari y Ishizawa, 1998). En adición, estudios desarrollados en nuestro laboratorio revelaron que en semillas no dormidas de tomate la aplicación exógena de JA, 11-OH-JA y 12-OH-JA, a concentraciones fisiológicas medias de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  M, ocasionó una inhibición diferencial de la germinación. JA  $10^{-4}$  M inhibió completamente la germinación en tanto que ambos derivados hidroxilados provocaron menor efecto inhibitorio (Andrade *et al.*, 2005).

Por otro lado, semillas de girasol de plantas madres crecidas con irrigación y en sequía mostraron diferencias en el porcentaje de germinación y en la composición de JAs. De este modo, las disparidades detectadas en el porcentaje de germinación podrían ser consecuencia de cambios en el contenido endógeno de JAs (Vigliocco *et al.*, 2007). En su conjunto, las evidencias mencionadas revelan que los niveles de JAs exhiben cambios característicos durante la embriogénesis, germinación y crecimiento temprano.

## **HIPÓTESIS**

1. Los niveles endógenos de JAs son cuantitativamente diferentes en semillas de girasol dormidas y no dormidas.
2. Los perfiles hormonales difieren en las distintas partes de la semilla, lo cual incide en su capacidad germinativa y en consecuencia en el grado de dormición.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar los niveles endógenos de JAs en semillas secas de líneas endocriadas dormida (B123) y no dormida (B91), y correlacionarlos con su capacidad germinativa.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Cuantificar los niveles endógenos de JA, 12-OH-JA y JA-Ile en embrión y pericarpo de semillas secas de las líneas B123 y B91.
2. Correlacionar el grado de dormición y la capacidad germinativa de ambas líneas con los niveles hormonales endógenos.

## MATERIALES, TÉCNICAS Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba. Argentina.

### Material vegetal

Semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) de dos líneas endocriadas: B123 y B91, dormida y no dormida al momento de cosecha respectivamente, fueron provistas por EEA-INTA Manfredi y se utilizaron para la realización de los ensayos programados.

### Evaluación del porcentaje de germinación

Veinticinco semillas (por repetición), desinfectadas con hipoclorito de sodio 3%, provenientes de distintos tiempos post-cosecha (0, 11, 22, 33 y 44 días), se sembraron en bandejas de plástico entre toallas de papel humedecidas a saturación con agua destilada. Las bandejas, cubiertas con bolsas de nylon a fin de lograr una adecuada presión de vapor ambiental cercana a la saturación, se colocaron a germinar en cámara de crecimiento Conviron E15 programada con 8 h de oscuridad a 18 °C y 90% de HR y 16 h de luz ( $130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ) a 28 °C y 80% de HR. El recuento final de germinación se realizó a los 10 días para cada tiempo post-cosecha. La evaluación del poder germinativo se efectuó mediante el recuento de semillas germinadas. Como criterio de germinación se consideró la profusión de la radícula a través del pericarpo. Las experiencias se realizaron por cuadruplicado.

### Obtención de embrión y pericarpo

Veinticinco semillas fueron seccionadas en embrión y pericarpo. Inmediatamente estas partes se congelaron en N<sub>2</sub> líquido, liofilizaron y conservaron a -80 °C hasta las determinaciones hormonales. Las experiencias se realizaron por cuadruplicado.

### Extracción, purificación y cuantificación de JAs

Los niveles hormonales fueron determinados en embrión y pericarpo de semillas secas a diferentes tiempos: 0, 11, 22, 33 y 44 días post-cosecha. La extracción y purificación de JA, 12-OH-JA y JA-Ile se llevó a cabo según protocolo modificado de Durgbanshi *et al.*, (2005). Para ello, 200 mg de peso seco se trituró con N<sub>2</sub> líquido y homogeneizó con 5 ml de agua deionizada (solvente de extracción). Los extractos se transvasaron a tubos Falcon y se adicionaron 50 ng de (<sup>2</sup>H<sub>6</sub>)-JA y 200 ng de 12-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)OAc-JA y (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-JA-Ile como estándares internos. Cada muestra se pasó por brevemente por ultraturrax para completar la

homogeneización y equilibración de estándares. Luego se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min. Se recogió el sobrenadante ajustándose el pH a 2,8 con ácido acético 15%. Posteriormente se realizó una doble partición con éter etílico, se descartaron las fases acuosas y se recogieron las fases orgánicas, llevándose a sequedad en evaporador rotativo. Los extractos secos se resuspendieron en 1,5 ml de metanol, filtraron a través de un filtro de jeringa (velocidad de flujo menor a 1ml/min.) y secaron bajo vacío a 35 °C en SpeedVac. La cuantificación de estos compuestos se realizó mediante LC/MS-MS. Para ello, los extractos secos se resuspendieron con 50 µl de MeOH para la purificación y análisis mediante un cromatógrafo Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una bomba cuaternaria con auto inyector de muestra. Se utilizó una columna Resteck C<sub>18</sub> (Resteck USA, 2.1 x 100 mm, 5 µm) a 25 °C, con un volumen de inyección de 10 µl. La elución se llevó a cabo en gradiente con un sistema de solvente binario: 0.2% HOAc en H<sub>2</sub>O (solvente B)/ MeOH (solvente A) a una velocidad de flujo de 200 µl min<sup>-1</sup>, procediendo con las siguientes proporciones (v/v) de solvente A: (t (min), %A):(0, 40), (25, 80). Al final de cada corrida se establecieron 7 min de equilibración de la columna. A continuación, el análisis espectral y de masas fue realizado en un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo (Micromass Quatro Ultima<sup>tm</sup> PT, Manchester City, UK). Se utilizó como fuente de ionización un electrospray negativo (ESI), produciendo moléculas [M-H] y siendo la energía de cono de -35 mV. La identificación y cuantificación de JA, 12-OH-JA y JA-Ile se efectuó en el modo de Monitoreo de Reacciones Múltiples (MRM), empleando para los metabolitos endógenos y sus formas deuteradas las siguientes transiciones: JA (*m/z* 209/59) y [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-JA (*m/z* 215/59); 12-OH-JA (*m/z* 225/147) y [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-12-OH-JA (*m/z* 227/147); JA-Ile (*m/z* 322/130) y [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-JA-Ile (*m/z* 325/135). Para este sistema los compuestos de interés eluyen a 9':30'' (tiempo de retención de 12-OH-JA), 13':45'' (tiempo de retención de JA) y 17':80'' (tiempo de retención de JA-Ile). La energía de colisión utilizada fue de 15 eV.

### **Reproducibilidad de las determinaciones**

Las experiencias se realizaron utilizando un diseño totalmente aleatorizado. Las determinaciones hormonales se efectuaron a partir de cuatro extracciones independientes (4 réplicas técnicas) de embrión y pericarpo y se realizó una inyección por cada muestra en el equipo LC/MS-MS.

### **Análisis estadístico**

Las diferencias significativas entre medias de las variables evaluadas se determinaron mediante Análisis de la Varianza de una vía (ANNOVA), utilizando a posteriori un test de Rangos Múltiples (LSD de Fisher;  $p \leq 0.05$ ). Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados

estadísticamente significativos. El Análisis de correlación lineal de Pearson se realizó con el objetivo de establecer el grado de asociación entre capacidad germinativa y dormición de las semillas/niveles hormonales endógenos de embrión y pericarpo. El software empleado fue Statgraphics Plus, versión 3, Manugistics 1997.



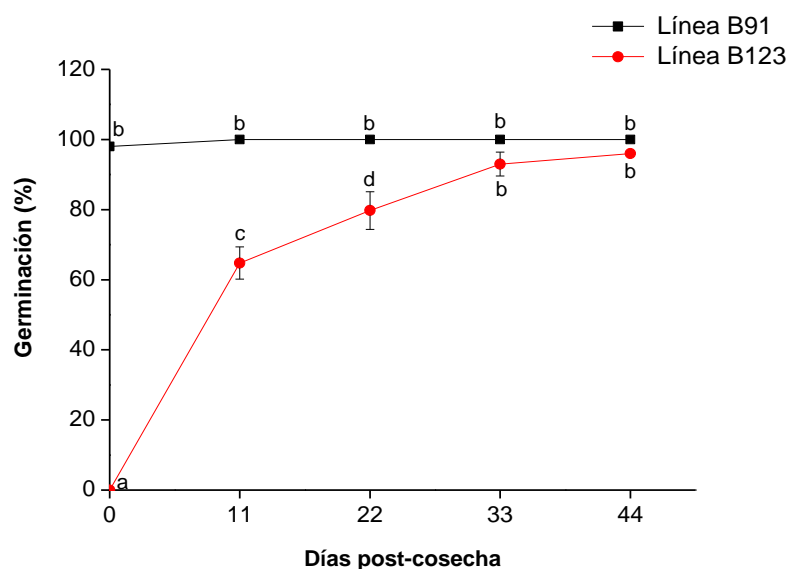
## RESULTADOS

### Evaluación de poder germinativo

Una de las variables evaluadas fue el poder germinativo de las semillas de las líneas B91 y B123 al momento de cosecha (0 días post-cosecha) y durante cuatro tiempos post-cosecha diferentes: 11, 22, 33 y 44 días (Fig. 4).

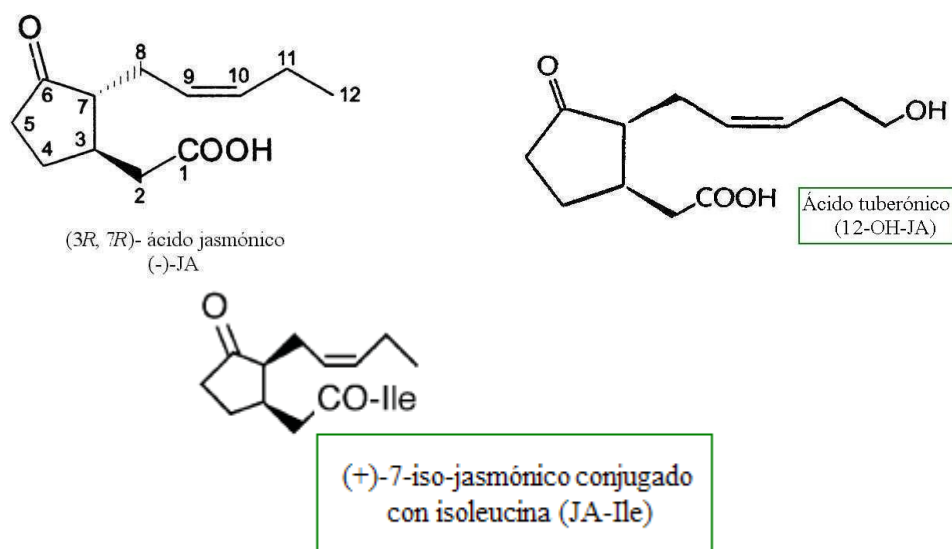
Las semillas de la línea B91 mostraron un poder germinativo mayor comparado con el de las semillas de la línea B123. Más aún, en todos los tiempos post-cosecha los porcentajes de germinación de la línea B91 fueron cercanos a 100%.

Las semillas de la línea B123 evidenciaron un incremento significativo y sostenido en el poder germinativo hasta los 33 días post-cosecha, alcanzando a los 44 días un porcentaje de germinación de 96%, similar al de las semillas de la línea B91.



**Fig. 4.** Evolución del porcentaje de germinación de semillas de las líneas B91 y B123 durante los diferentes tiempos post-cosecha ( $n=4 \pm SE$ );  $p \leq 0.05$ .

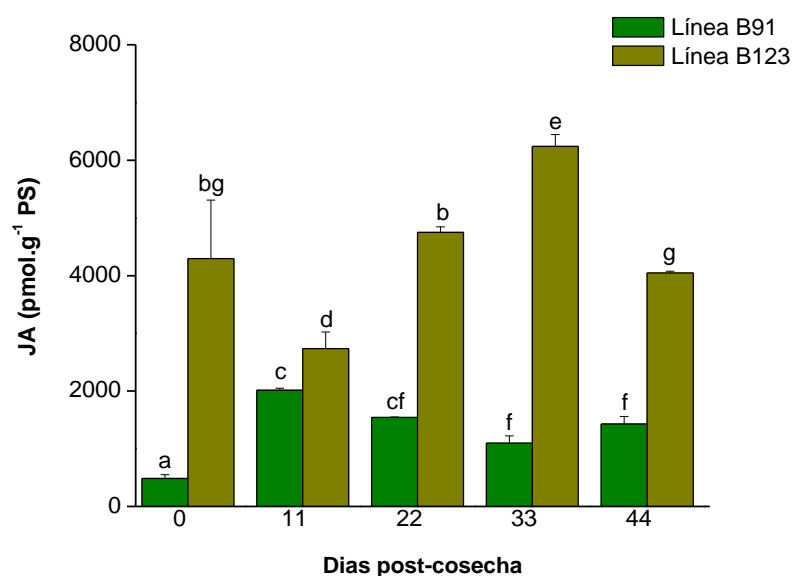
Entre los miembros más comunes de la familia de los JAs se detectaron JA, 12-OH-JA y JA-Ile tanto en pericarpo como en embrión de semillas de las líneas B123 y B91 (Fig. 5).



**Fig. 5.** Estructura química de los compuestos aislados e identificados en semillas de las líneas B91 y B123.

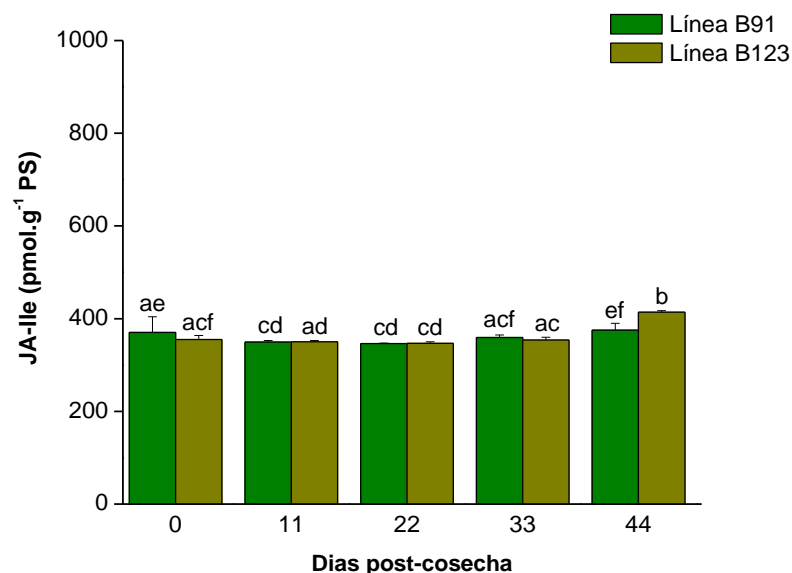
### Contenido endógeno de JAs en pericarpo de semillas secas

Comparando entre ambas líneas, en la B123 el contenido de JA en pericarpo fue significativamente más elevado respecto al detectado en la línea B91 en todos los tiempos post-cosecha analizados. Cabe destacar que esta diferencia fue más relevante a los 0 y 33 días post-cosecha: 7 y 6 veces, respectivamente (Fig. 6).



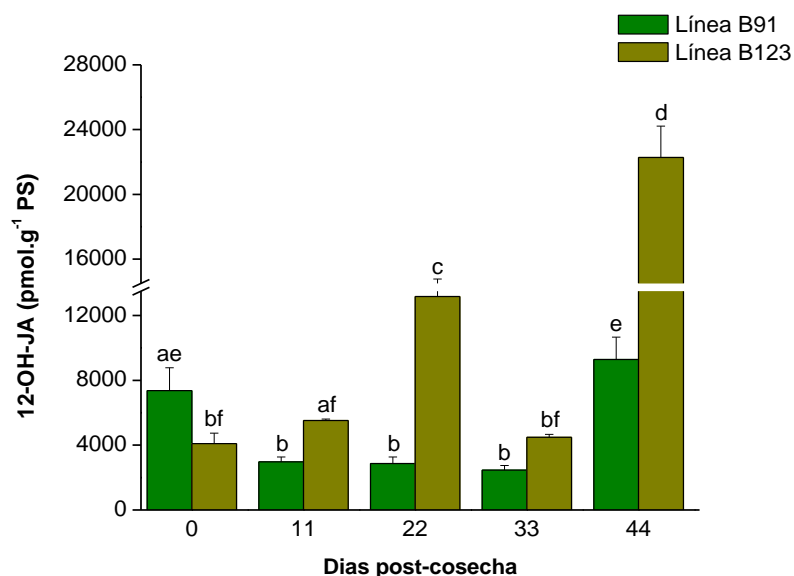
**Fig. 6.** Niveles endógenos de JA en pericarpo de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha ( $n=4 \pm SE$ );  $p \leq 0.05$ .

Por el contrario, los niveles de JA-Ile no presentaron diferencias significativas entre las dos líneas en estudio, registrándose valores aproximadamente similares ( $400 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$ ) en todos los tiempos post-cosecha. No obstante, en la línea B123 el contenido de este compuesto fue superior a los 44 días post-cosecha (Fig. 7).



**Fig. 7.** Niveles endógenos de JA-Ile en pericarpio de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha ( $n=4 \pm \text{SE}$ );  $p \leq 0.05$ .

En la Fig. 8 se muestran los niveles de 12-OH-JA detectados en pericarpio de ambas líneas. Al momento de cosecha (0 días post-cosecha) la línea B91 presentó un contenido de 12-OH-JA significativamente más elevado respecto al registrado en la línea B123; una tendencia opuesta se evidenció en los restantes tiempos post-cosecha. Por otra parte, a los 44 días post-cosecha se cuantificaron los mayores niveles endógenos de este compuesto en ambas líneas, y diferencias significativas fueron observadas entre ellas. En la línea B123 el aumento de 12-OH-JA fue aproximadamente 6 veces respecto a la línea B91.

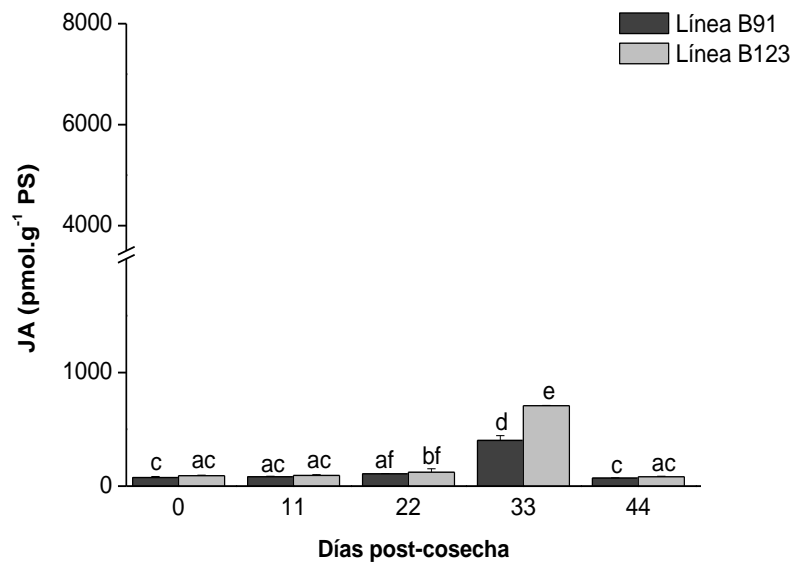


**Fig. 8.** Niveles endógenos de 12-OH-JA en pericarpo de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha ( $n=4 \pm SE$ );  $p \leq 0.05$ .

#### Contenido endógeno de JAs en embrión de semillas secas

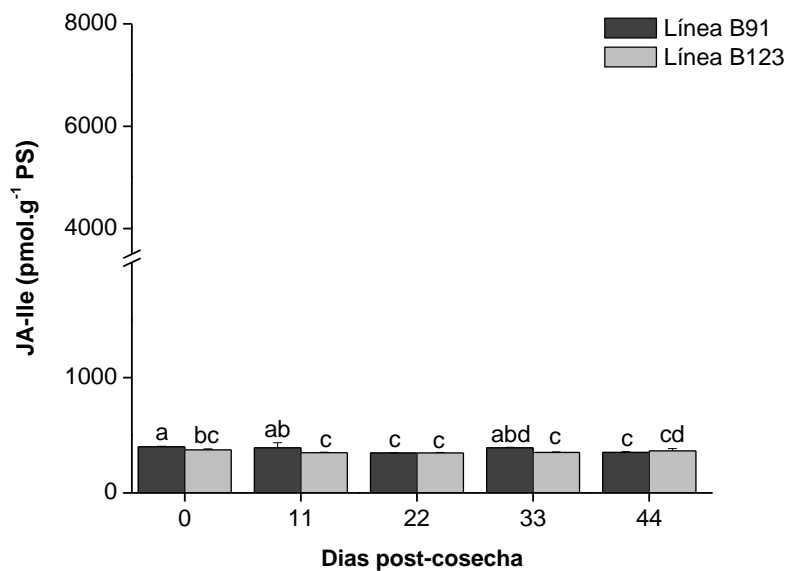
De manera similar al análisis hormonal en pericarpo, el contenido de JAs se evaluó en embriones de semillas de las líneas B91 y B123 (Figs. 9, 10 y 11).

Los resultados demostraron que en ambas líneas JA mantuvo un nivel bajo y relativamente estable a través de todos los tiempos post-cosecha. No obstante, a los 33 días post-cosecha se registró un leve incremento, aunque significativo, de este compuesto; siendo más notable en la línea B123 ( $707,9 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$ ) (Figs. 9).



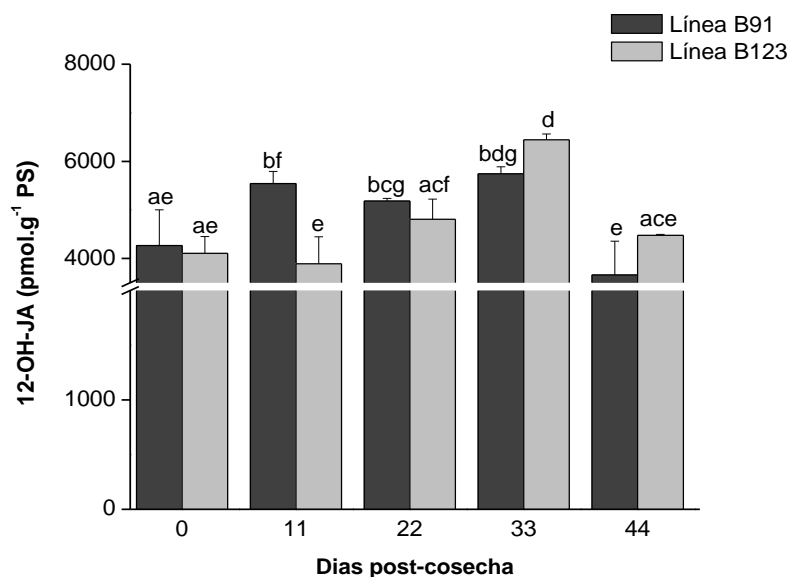
**Fig. 9.** Niveles endógenos de JA en embrión de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha ( $n=4 \pm SE$ );  $p \leq 0.05$ .

En la Fig. 10 se informan los resultados de la evaluación de JA-Ile durante los diferentes tiempos post-cosecha. En general, el contenido endógeno de este compuesto no se modificó de manera significativa en el transcurso del experimento, y se mantuvo bajo y constante en ambas líneas alcanzando valores de  $350 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$  aproximadamente.



**Fig. 10.** Niveles endógenos de JA-Ile en embrión de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha ( $n=4 \pm SE$ );  $p \leq 0.05$ .

Finalmente, en ambas líneas el contenido de 12-OH-JA presentó una dinámica fluctuante en el transcurso de todos los tiempos post-cosecha analizados. Cabe destacar una disminución de este compuesto a los 11 días post-cosecha en la línea B123 respecto a la línea B91, y esta variación fue estadísticamente significativa.



**Fig. 11.** Niveles endógenos de 12-OH-JA en embrión de semillas de las líneas B91 y B123 a diferentes tiempos post-cosecha ( $n=4 \pm SE$ );  $p \leq 0.05$ .

#### **Análisis de correlación entre porcentaje de germinación y niveles hormonales endógenos**

Una correlación positiva fue hallada entre porcentaje de germinación y niveles endógenos de JA en semillas de la línea B91 ( $r: 0,60$ ;  $p < 0,01$ ) (Tabla 1).

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
MODELO	1,64324	1	10,46	0,0046
RESIDUO	2,82692	18		
TOTAL	4,47	19		

**Tabla 1.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de JA ( $p < 0,01$ ).

$r^2$ : 0,36

Una segunda correlación positiva fue hallada entre porcentaje de germinación y niveles endógenos de JA-Ile en semillas de la línea B91 ( $r$ : 0,46;  $p < 0.05$ ) (Tabla 2).

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
MODELO	5976,58	1	5,06	0,0373
RESIDUO	21267,9	18		
TOTAL	27244,48	19		

**Tabla 2.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de JA-Ile ( $p < 0,01$ ).

$r^2$ : 0,21

## DISCUSIÓN

Se ha comprobado que durante la embriogénesis el ambiente en el cual crece la planta madre, la temperatura y el estadio de madurez de la semilla al momento de la cosecha influyen en el grado de dormición (Fenner, 1991). El mantenimiento de la dormición luego de la madurez es variable en las distintas especies; en aquellas en las que este estado persiste ofrece ventajas adaptativas para el futuro establecimiento de la plántula a la vez que permite la formación de bancos de semillas en el suelo. Así, para que la germinación se inicie las semillas deben ser capaces de perder su dormición (Filkelstein *et al.*, 2008). En este sentido, se han reportado diferentes tratamientos capaces de eliminarla tales como almacenamiento en seco post-maduración (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Filkelstein *et al.*, 2008). Éste implica cambios metabólicos y fisiológicos tanto en el embrión como en las cubiertas seminales (Leubner-Metzger, 2005).

En el presente trabajo, el análisis del poder germinativo de semillas de las líneas endocriadas B91 y B123 permitió diferenciar ambas líneas según su grado de dormición. En relación a este tema, Maiti *et al.*, (2006) informaron que en 59 genotipos cultivados de girasol tal característica mostró un alto porcentaje de heredabilidad (79%), indicando así que la misma puede ser potencialmente utilizada en el mejoramiento de híbridos de esta especie.

Las semillas de la línea B123 evidenciaron una importante capacidad germinativa a partir de los 33 días de ser cosechadas, lo cual implica que esta línea presenta una *baja dormición* en nuestras condiciones experimentales. En contraposición, semillas de la línea B91 exhibieron el máximo poder germinativo después de ser cosechadas, lo cual permitió caracterizar a esta línea como *no dormida*. De hecho, Subramanyam *et al.*, (2002) reportaron que diferentes genotipos de girasol mostraron amplia variabilidad en su grado de dormición: aquellos con un porcentaje de germinación promedio del 10% se consideraron “altamente dormidos”, con un porcentaje de germinación superior al 70% fueron considerados “no dormidos” y entre éstos, se detectaron algunos genotipos “altamente no dormidos” por presentar un porcentaje de germinación mayor al 80%. De acuerdo a lo anterior, se demuestra la existencia de variabilidad genotípica en el grado de dormición entre líneas endocriadas e híbridos de girasol, presentando estos últimos mayores niveles de dormición comparada con los genotipos cultivados.

Por otra parte, Oracz *et al.*, (2007) demostraron que la dormición de semillas de girasol puede ser revertida durante el almacenamiento en seco. La rápida disminución de la dormición detectada en la línea B123 podría atribuirse al almacenamiento post-cosecha en condiciones secas a 25 °C. Similarmente, Benech-Arnold *et al.*, (2006) reportaron que granos dormidos de cebada germinaron fácilmente a 20 °C.



Ha sido documentado que las fitohormonas son responsables de los cambios fisiológicos que ocurren durante el almacenamiento de las semillas, lo cual a menudo se refleja en una pérdida del estado de dormición. Es decir, se han reportado diferencias en los niveles hormonales endógenos como así también en el camino de transducción de sus señales entre semillas dormidas y aquellas que han sido almacenadas por diferentes períodos en condiciones secas (Iglesias-Fernández *et al.*, 2011). Diferentes trabajos han demostrado que JAs desempeñarían una importante función en el control de la pérdida de dormición y/o en la germinación (Kucera *et al.*, 2006; Preston *et al.*, 2009; Dave *et al.*, 2011). Preston *et al.*, (2009) informaron un contenido endógeno de JA y JA-Ile notablemente diferentes en semillas secas de *Arabidopsis* de los ecotipos Col (no dormido) y Cvi (dormido).

Por otra parte, aplicaciones exógenas de JAs han mostrado resultados contradictorios, con algunos efectos promotores y otros inhibidores de la germinación según las semillas se encuentren o no dormidas. En este sentido, se observó que JA y Me-JA fueron capaces de inhibir la germinación en *Brassica napus*, *Linum usitatissimum*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis* y *Helianthus annuus* (Corbineau *et al.*, 1988; Wilen *et al.*, 1991; Miersch *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2009). En adición, Andrade, (2007) informó el importante rol inhibitorio de JA sobre la germinación de semillas de tomate silvestres, aunque recientemente, en semillas de *Arabidopsis* se demostró que OPDA fue más efectivo que JA como inhibidor de la germinación. Contrariamente, Yildiz *et al.*, (2008) informaron que el tratamiento con JA exógeno estimula la germinación en semillas dormidas de pera.

En relación a lo antedicho, Kramell *et al.*, (2000) proponen que la respuesta a JA exógeno es diferente de la observada por incremento endógeno, indicando que la vía de señalización de un compuesto aplicado exógenamente sería distinta del producido endógenamente.

En la línea B123, el estado de dormición podría ser regulado negativamente por JA, y por las características estructurales del pericarpo, que a pesar de la presencia de compuestos fenólicos, en este caso particular no limita la profusión de la radícula.

La máxima acumulación de JA en embrión de la línea B123 a los 33 días post-cosecha permite sugerir la participación de este compuesto como posible inductor de la germinación.

En referencia a los derivados de JA, el contenido de 12-OH-JA en embrión a los 33 días post-cosecha parece estar relacionado con la estimulación de la germinación en la línea B123; evidenciando de esta manera su posible interacción con JA sobre este proceso. Además, esta acumulación preferencial de 12-OH-JA indicaría que el mecanismo hidroxilativo es funcional durante la formación de la semilla, hecho que concuerda con lo observado por Andrade (2007) en semillas silvestres de tomate.

Considerando conjuntamente los niveles hormonales endógenos y el porcentaje de germinación registrados en la línea B123 a los 33 días post-cosecha, se puede reafirmar que en girasol la dormición atribuida al embrión comprende un breve período de tiempo.

Fonseca *et al.*, (2009) propusieron a JA-Ile como forma hormonal bioactiva capaz de inducir respuestas relacionadas a JA, tales como inhibición del crecimiento radical y acumulación de antocianinas. En adición, ha sido documentado que los niveles de este compuesto varían notablemente durante el desarrollo de flores de tomate, lo que podría implicar su papel regulador en dicho proceso (Hause *et al.*, 2000). En contraposición, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, JA-Ile no parece desempeñar un papel determinante en la regulación de la dormición y/o germinación de semillas de girasol.

## CONCLUSIONES

- JA estaría involucrado en la liberación de la dormición de la línea B123, y por lo tanto, podría inducir el proceso de germinación.
  
- 12-OH-JA interactuaría con JA en la regulación de la dormición.
  
- JA-Ile no estaría implicado en el control de la dormición y/o germinación de semillas de girasol.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABDALA, G., G. CASTRO, O. MIERSCH y D. PEARCE. 2002. Changes in jasmonate and gibberellin levels during development of potato plants (*Solanum tuberosum*). *Plant Growth Reg.* 36: 121-126.
- ABDALA, G. y A. CENZANO. 2006. Biosíntesis de jasmonatos y participación en procesos del desarrollo vegetal. En: Temas de Fisiología Vegetal. Eds. Sociedad de Fisiología Vegetal ISBN: 950-665-403-4.
- ALBA-ORDÓÑEZ, A. y M. LLANOS-COMPANY. 1990. *El cultivo del girasol*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 158 p.
- ANDRADE, A., A. VIGLIOCCO, S. ALEMANO, O. MIERSCH, M.A. BOTELLA y G. ABDALA. 2005. Endogenous jasmonates and octadecanoids in hypersensitive tomato mutants during germination and seedling development in response to abiotic stress. *Seed Sci. Res.* 15: 309-318.
- ANDRADE, A. 2007. *Ácido jasmónico, abscísico y sus metabolitos en las respuestas a estrés abiótico de un cultivar silvestre y mutantes de tomate hipersensibles*. Tesis doctoral. Fac. de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 88 p.
- ANDRIANI, P. 2004. Mercado de Girasol En: \_\_. *El cultivo de Girasol en Siembra Directa*. Ed. Gustavo Duarte, B. Aires, p: 16-26.
- ASAGIR. 2008. El girasol importancia económica. Informe mensual al 20.07.2011. En: <http://www.asagir.org.ar/asagir2008/importancia-economica.asp>. pdf. Consultado 15.08.2011.
- AVANCI, N.C., D.D. LUCHE, G.H. GOLDMAN y M.H.S. GOLDMAN. 2010. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defence and reproduction. *Genet. Mol. Res.* 9: 484-505.
- BAIR, N.B., S.E. MEYER y P.S. ALLEN. 2006. A hydrothermal after-ripening time model for seed dormancy loss in *Bromus tectorum* L. *Seed Sci. Res.* 16: 17-28.
- BENECH-ARNOLD, R.L., N. GUALANO, J. LEYMARIE, D. CÔME y F. CORBINEAU. 2006. Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *J. Exp. Bot.* 57: 1423-1430.
- BERGER, S. 2002. Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress. *Planta* 214: 497-504.
- BEWLEY, J.D. 1997. Seed germination and plant dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- BLECHERT, S., C. BOCKELMANN, M. FÜBLEIN, T. VON SCHRADER, B.A. STELMACH, U. NIELSEN y E.W. WEILER. 1999. Structure-activity relationships reveal

two sub-groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. *Planta* 207: 470-479.

CORBINEAU, F., R.M. RUDNICKI y D. CÔME. 1988. The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Reg.* 7: 157-169.

CORBINEAU, F., B. GOUBLE, S. LECAT y D. CÔME. 1991. Stimulation of germination of dormant oat (*Avena sativa* L.) seeds by ethanol and other alcohol. *Seed Sci. Res.* 1: 21-28.

CORBINEAU, F., S. BAGNIOL y D. CÔME. 1990. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed dormancy and its regulation by ethylene. *Is. J. Bot.* 39: 313-325.

CREELMAN, R.A. y J.E. MULLET. 1997. Biosynthesis and actions of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381.

DAVE, A., M.L. HERNÁNDEZ, Z. HE, V.M.E. ANDRIOTIS, F.E. VAISTIJ, T.R. LARSON y I.A. GRAHAM. 2011. 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 583-599.

DÍAZ-ZORITA, M., G. DUARTE, E. PLANTE y M. FERNÁNDEZ CANIGIA. 2003. *El cultivo de girasol*. Asociación Argentina de Girasol: 10. Bs. As., Argentina.

DURGBANSHI, A., V. ARBONA, O. POZO, O. MIERSCH, J.V. SANCHO y A. GÓMEZ-CADENAS. 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8437-8442.

FENNER, M. 1991. The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Sci. Res.* 1: 75-84.

FENNER, M. y K. THOMPSON. 2005. The ecology of seeds. *Seed Sci. Res.* 15: 365-366.

FEURTADO, J.A. y A.R. KERMODE. 2007. A merging of paths: abscisic acid and hormonal cross-talk in the control of seed dormancy maintenance and alleviation. En: \_\_\_. Eds. Bradford K., Nonogaki H. *Seed Development, Dormancy and Germination*. Annual Plants Reviews 27. Blackwell Publishing. Oxford. pp: 176-223.

FINCH-SAVAGE, W.E. y G. LEUBNER-METZGER. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.

FINKELSTEIN, R., S. GAMPALA y C. ROCK. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15-S45.

FINKELSTEIN, R., W. REEVES, T. ARIIZUMI y C. STEBER. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 387-415.

FONSECA, S., A. CHINI, M. HAMBERG, B. ADIE., A. PORZEL, R. KRAMELL, O. MIERSCH, C. WASTERNAK y R. SOLANO. 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 344-350.

- GAY, C., F. CORBINEAU y D. CÔME. 1991. Effects of temperature and oxygen on seed germination and seedling growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Environ. Exp. Bot.* 31: 193-200.
- GIAYETTO, O. 1985. *Morfología del girasol (Helianthus annuus L.)*. Monografía inédito, 98 p. (Cátedra producción vegetal, producción de cultivos oleaginosos).
- HAUSE, B., I. STENZEL, O. MIERSCH, H. MAUCHER y R. KRAMELL. 2000. Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: alene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant J.* 24: 113-126.
- HAUSE, B., W. MAIER, O. MIERSCH, R. KRAMELL y D. STRACK. 2002. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol.* 130: 1213-1220.
- HILHORST, M. 2007. Seed dormancy release in *Arabidopsis* Cvi by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *Plant J.* 51: 60-78.
- IGLESIAS-FERNÁNDEZ, R., M. RODRÍGUEZ-GACIO y A. MANTILLA. 2011. Progress in research on dry afterripening. *Seed Sci. res.* 21: 69-80.
- KARSSSEN, C.M. y D.E. LACKA. 1986. A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. En: *Plant Growth Substances*: 315-323. Ed. M. Bopp. Berlin: Springer-Verlag.
- KELLY, K.M., J. VAN STADEN y W.E. BELL. 1992. Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Reg.* 11: 201-209.
- KEPCZYNSKI, J. y B. BIALECKA. 1994. Stimulatory effect of ethephon, ACC, gibberellin A-3 and A-4+7 on germination of methyl jasmonate inhibited *Amaranthus caudatus* L. seeds. *Plant Growth Reg.* 14: 211-216.
- KOO, J. K., A. XIAOLI GAO, A. D. JONES y G.A. HOWE. 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J.* 59: 974-86.
- KRAMELL, R., R. ATZORN, G. SCHNEIDER, O. MIERSCH, C. BRÜCKNER, J. SCHMIDT, G. SEMBDNER y B. PARTHIER. 1995. Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Plant Growth Regul.* 14: 29-36.
- KRAMELL, R., O. MIERSCH, R. ATZORN, B. PARTHIER y C. WASTERACK. 2000. Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol.* 123: 177-187.
- KUCERA, B., M.A. COHN y G. LEUBNER-METZGER. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281-307.
- KUCERA, B., M.A. COHN y G. LEUBNER-METZGER. 2006. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281-307.

- LE PAGE-DEGIVRY, M.T., P. BARTHE y G. GARELLO. 1990. Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus* embryo dormancy. *Plant Physiol.* 92: 1164-1168.
- LEUBNER-METZGER G. 2005. Beta-1,3-glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant J.* 41: 133-145.
- LI, B. y M.E. FOLEY. 1997. Genetic and molecular control of seed dormancy. *Trends Plant Sci.* 2: 384-389.
- MAGyP. 2011. Estimaciones Agrícolas. Informe mensual al 20.07.2011. Website: [http://www.sija.gov.ar/estimaciones\\_agricolas/02mensual/\\_archivo/1100002011/110721Informe Mensual Julio 2011.pdf](http://www.sija.gov.ar/estimaciones_agricolas/02mensual/_archivo/1100002011/110721Informe%20Mensual%20Julio%202011.pdf). Consultado 15.08.2011.
- MAITI, R.K., P. VIDYASAGAR, S.C. SHAHAPUR y G.J. SEILER. 2006. Studies on genotypic variability and seed dormancy in sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.). *Indian J. Crop Sci.* 1: 84-87.
- MANDAOKAR, A., V.D. KUMAR, M. AMWAY y J. BROWSE. 2003. Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development. *Plant Mol. Biol.* 52: 775-786.
- MIERSCH, M., J. NEUMERKEL, M. DIPPE, I. STENZEL y C. WASTERNAK. 2008. Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* 177: 114-127.
- NAMBARA, E. y A. MARION-POLL. 2005. Abscisic Acid biosynthesis and metabolism. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56: 165-185.
- NOJAVAN-ASGHARI, M. y K. ISHIZAVA. 1998. Inhibitory effects of methyl jasmonate on the germination and ethylene production in cocklebur seeds. *Plant Growth Regul.* 17: 13-18.
- OH, E., H. KANG, S. YAMAGUCHI, J. PARK, D. LEE, Y. KAMIYA y G. CHOIA. 2009. Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 403-419.
- ORACZ, K., H. EL-MAAROUF-BOUTEAU., J. FARRANT., K. COOPER., M. BELGAZHI., C. JOB, D. JOB, F. CORBINEAU y C. BAILLY. 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism of seed dormancy alleviation. *Plant J.* 50: 452-465.
- PARTHIER, B. 1991. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypothesis on their actions. *Bot. Acta* 104: 446-454.
- PRÉ, M. 2006. *ORA EST: Functional analysis of jasmonate-responsive AP2/ERF-domain transcription factors in Arabidopsis thaliana*. PhD thesis. Leiden, Leiden University, The Netherlands 141 p.

- PRESTON J., K. TATEMATSU, Y. KANNO, T. HOBBO, M. KIMURA, Y. JIKUMARU, R. YANO, Y. KAMIYA y E. NAMBARA. 2009. Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant Cell Physiol.* 50: 1786-1800.
- SEMBDNER, G. y D. GROSS. 1986. Plant growth substances of plant and microbial origin. En: *Plant Growth Substances*. Ed. M. Bopp. Berlin: Springer-Verlag.
- SUBRAHMANYAM, S.V.R., S.S.R. KUMAR y A.R.G. RANGANATHA. 2002. Genotypic differences for seed dormancy in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Seed Sci. Res.* 30: 325-327.
- THOMPSON, K. 2000. The functional ecology of soil seed banks. En: *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. Ed. M. Fenner. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI Publishing.
- VIGLIOCCO, A., S. ALEMANO, O. MIERSCH, D. ALVAREZ y G. ABDALA. 2007. Endogenous jasmonates during sunflower germination in seeds from plants grown under different soil moisture content. *Seed Sci. Res.* 17: 91-98.
- WASTERNAK, C. y B. HAUSE. 2002. Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress response and development. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 165-221.
- WASTERNAK, C. y E. KOMBRINK. 2010. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem. Biol.* 5: 63-77.
- WILEN, R.W., G.J.H. VAN ROOIJEN, D.W. PEARCE, R.P. PHARIS, L.A. HOLBROOK y M.M. MOLONEY. 1991. Effects of jasmonic acid on embryo-specific processes in *Brassica* and *Linum* oilseeds. *Plant Physiol.* 95: 399-405.
- WILEN, R.W., B.E. EWAN y L.V. GUSTA. 1994. Interaction of abscisic acid and jasmonic acid on the inhibition of seed germination and the induction of freezing tolerance. *Can. J. Bot.* 72: 1009-1017.
- YAMAGUCHI, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225-51.
- YAMANE, H., H. ABE y N. TAKAHASHI. 1981. Jasmonic acid and methyl ester in pollen and anthers of three *Camellia* species. *Plant Cell Physiol.* 23: 1125-1127
- YILDIZ, K., F. MURADOGLU y H. YILMAZ. 2008. The effect of jasmonic acid on germination of dormant and nodormant pear (*Pyrus communis* L.) seeds. *Seed Sci. Technol.* 6: 569-574.