

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

**Trabajo Final presentado para optar al
Grado de Ingeniero Agrónomo**

**ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS DE GIRASOL (*Helianthus
annuus* L.) CON DISTINTO GRADO DE DORMICIÓN:
PARTICIPACIÓN DE LOS JASMONATOS Y EL ÁCIDO
SALICÍLICO**

**Alumna: Natalí Vanesa Riera
DNI: 33647326**

**Directora: Dra. Ana Vigliocco
Co-Directora: Dra. Andrea Andrade**

**Río Cuarto, Córdoba, Argentina
Agosto 2013**

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

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Almacenamiento de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) con distinto grado de dormición: participación de los jasmonatos y el ácido salicílico

Autora: Natalí Vanesa Riera
DNI: 33.647.326

Directora: Dra. Ana E. Vigliocco
Co-Directora: Dra. Andrea M. Andrade

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

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Aprobado por la Secretaría Académica: ____/____/____.

Secretario Académico

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	VI
SUMMARY	VII
INTRODUCCIÓN	1
- Origen, distribución e importancia económica de <i>Helianthus annuus</i> L.....	1
- Descripción vegetal.....	2
- Dormición y su influencia en girasol.....	3
- Jasmonatos (JAs): biosíntesis y funciones en las plantas.....	5
- Ácido Salicílico (SA): biosíntesis y funciones en las plantas.....	8
- Efectos de JAs y SA en la germinación y dormición.....	11
- Hipótesis.....	12
- Objetivo general.....	12
- Objetivos específicos.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
- Material vegetal.....	13
- Condiciones de almacenamiento.....	13
- Evaluación del porcentaje de germinación.....	13
- Obtención de pericarpo para las determinaciones hormonales.....	13
- Extracción y cuantificación de hormonas.....	14
- Diseño experimental y Análisis estadístico.....	15
RESULTADOS	16
- Energía y poder germinativo.....	16
- Niveles hormonales endógenos en pericarpo de aquenios secos.....	17
- Niveles hormonales endógenos en pericarpo de aquenios embebidos.....	19
- Análisis de correlación entre el porcentaje de germinación y niveles hormonales endógenos de la línea B123.....	25
- Análisis de correlación entre el porcentaje de germinación y niveles hormonales endógenos de la línea B91.....	27
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA CITADA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN	Pág.
Fig. 1. Aqueño de girasol. Se observa la semilla, la cubierta seminal y el pericarpo.....	2
Fig. 2. Sección transversal del pericarpo (P) de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) en madurez fisiológica.....	3
Fig. 3. Estructura química del ácido jasmónico.....	5
Fig. 4. Biosíntesis de JA.....	7
Fig. 5. Estructura química del ácido salicílico.....	8
Fig. 6. Biosíntesis de SA.....	10
RESULTADOS	
Fig. 7. Energía germinativa relativa de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.....	16
Fig. 8. Poder germinativo relativo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.....	17
Fig. 9. Niveles endógenos de OPDA, JA, JA-Ile y SA (pmol.g PS ⁻¹) en pericarpo de aquenios secos de girasol de las líneas B123 y B91 al momento de cosecha (0 días post-cosecha)...	18
Fig. 10. Niveles endógenos de OPDA, JA, JA-Ile y SA (pmol.g PS ⁻¹) en pericarpo de aquenios secos de girasol de las líneas B123 y B91 a los 33 días post-cosecha almacenados a 25°C±1°C....	18
Fig. 11. Niveles endógenos de OPDA, JA, JA-Ile y SA (pmol.g PS ⁻¹) en pericarpo de aquenios secos de girasol de las líneas B123 y B91 a los 33 días post-cosecha almacenados a -20°C±1°C...	19
Fig. 12. Niveles endógenos de OPDA (pmol.g PS ⁻¹) en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha.....	20
Fig. 13. Niveles endógenos de OPDA (pmol.g PS ⁻¹) durante la imbibición en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a 25°C±1°C por 33 días post-cosecha..	20
Fig. 14. Niveles endógenos de OPDA (pmol.g PS ⁻¹) durante la imbibición en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a -20°C±1°C por 33 días post-cosecha	21
Fig. 15. Niveles endógenos de JA (pmol.g PS ⁻¹) en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha.....	22
Fig. 16. Niveles endógenos de JA (pmol.g PS ⁻¹) durante la imbibición en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a 25°C±1°C por 33 días post-cosecha.....	22
Fig. 17. Niveles endógenos de JA (pmol.g PS ⁻¹) durante la imbibición en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a -20°C±1°C por 33 días post-cosecha.....	23
Fig. 18. Niveles endógenos de SA (pmol.g PS ⁻¹) en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha.....	24

Fig. 19. Niveles endógenos de SA (pmol.g PS ⁻¹) durante la imbibición en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a 25°C±1°C por 33 días post-cosecha.....	24
Fig. 20. Niveles endógenos de SA (pmol.g PS ⁻¹) durante la imbibición en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a -20°C±1°C por 33 días post-cosecha.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

RESULTADOS

Tabla 1. Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de JA (p<0.05).....	26
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<0.10).....	26
Tabla 3. Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de SA (p<0.01).....	27
Tabla 4. 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).....	28
Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de SA (p<0,05).....	28

RESUMEN

Jasmonatos (JAs) y Ácido Salicílico (SA) están involucradas en los procesos de dormición y germinación. El objetivo de este trabajo fue analizar niveles endógenos de ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido jasmónico (JA), ácido jasmónico conjugado con isoleucina (JA-Ile) y SA en pericarpo de aquenios secos y embebidos de *Helianthus annuus* L de las líneas endocriadas B123 (con dormición a cosecha) y B91 (sin dormición a cosecha) luego de su almacenamiento en diferentes condiciones, y correlacionarlos con su capacidad germinativa. Veinticinco aquenios por bandeja se colocaron a germinar entre papel húmedo en una cámara de crecimiento. A los 4 días se determinó energía germinativa y a los 10 días poder germinativo. Las condiciones de almacenamiento de los aquenios fueron 0 día post-cosecha y 33 días post-cosecha a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las hormonas se identificaron y cuantificaron por Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas Tándem (LC-ESI/MS-MS). Los resultados mostraron que a mayor temperatura de almacenamiento (25°C) los aquenios B123 pierden su dormición y alcanzan porcentajes de germinación similares a aquellos no dormidos. A 0 días post-cosecha, los pericarpos de los aquenios secos B123 mostraron mayores niveles de OPDA y SA respecto a los pericarpos B91. Pericarpos de aquenios secos de ambas líneas almacenados por 33 días a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ mostraron niveles de OPDA y JA considerablemente menores, en relación a las otras condiciones. En pericarpo de aquenios embebidos, OPDA presentó mayores niveles a 0 y 33 días post-cosecha a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Una tendencia de acumulación diferente y menores niveles de JA se detectaron a los 33 días post-cosecha a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, mientras que SA presentó una dinámica de acumulación similar en las tres condiciones experimentales. Los resultados demuestran que JAs y SA difieren cuantitativamente entre pericarpos de aquenios de ambas líneas en relación al tiempo, temperatura de almacenamiento, y durante el proceso de imbibición. Asimismo, OPDA estaría involucrado en el proceso de germinación y dormición en girasol.

Palabras claves: ácido salicílico, dormición, *Helianthus annuus* L., jasmonatos, pericarpo

SUMMARY

Jasmonates (JAs) and salicylic acid (SA) are involved in dormancy and germination process. The aim of this work was to analyze the endogenous levels of 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), jasmonic acid (JA), jasmonic acid conjugated with isoleucine (JA-Ile) and SA in pericarp of sunflower dry and imbibed achenes of B123 (dormant) and B91 (non-dormant) inbred lines after storage under different conditions and correlated with their germinative capacity. Twenty-five achenes were placed to germinate between filter papers towels moistened in a chamber. At 4 days germination energy was determined and at 10 days the final count of germination was registered. Storage conditions analyzed were 0 days post-harvest, 33 days post-harvest at $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ and $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. The hormones were identified and quantified by LC-ESI/MS-MS. The results showed that storage at room temperature (25°C) was effective in release dormancy of B123 achenes and their germination percentage was similar to B91. At 0 days post-harvest, a higher OPDA and SA level was observed in B123 pericarp of dry achenes compared to B91. At 33 days post-harvest, pericarps of B123 and B91 storage at -20°C showed a very low OPDA and JA level in both lines respect to the other storage conditions. In pericarps of embeded achenes, OPDA showed a high level at 0 and 33 days post-harvest at $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. A different tendency of accumulation and low JA levels were detected at 33 days post-harvest at -20°C . SA showed a similar dynamic accumulation in all experimental conditions analyzed. The results demonstrated that JAs and SA differ quantitatively in pericarps of both lines in relation to time, storage temperature, and during the imbibition process. Also, OPDA could be involved in sunflower germination and dormancy.

Keywords: dormancy, *Helianthus annuus* L., jasmonates, pericarp, salicylic acid.

INTRODUCCIÓN

Origen, distribución e importancia económica de *Helianthus annuus* L.

Helianthus annuus L. (girasol) es una especie nativa de Estados Unidos, Canadá y el norte de México. Actualmente se encuentra distribuido en el suroeste de Estados Unidos y norte de México, el Caribe, Oceanía, Europa, África y Asia (Stevens, 2000). En nuestro país, la siembra de este cultivo se realiza en el Norte de Santa Fe y Chaco (17%), Córdoba y Entre Ríos (15%), oeste de Buenos Aires, La Pampa y San Luis (25%) y sudeste y sudoeste de Buenos Aires (43%) (Escande, 2009).

La producción en Argentina durante las dos últimas décadas fue variable, alcanzando un pico que superó los 7 millones de tn en 1998/1999 y descendiendo luego hasta un valor aproximado de 3,4 millones de tn en el período 2011/2012. En las últimas cinco campañas (2009/2013) la superficie implantada con girasol fue de 1.740.968 ha, mientras que en la campaña 2012/2013 fue de 1.650.000 ha y el rinde promedio de 1.878 kg/ha (MINAGRY, 2013). Argentina es el segundo exportador mundial de aceites después de Ucrania y el tercer exportador de pellet y harinas. La exportación argentina de aceite de girasol representa aproximadamente el 22 % del comercio mundial; esta activa participación en la comercialización de subproductos del girasol representa un aporte sostenido e importante de divisas para el país. Durante la campaña 2010/2011 se exportaron 550,28 tn de aceite, lo cual implicó aproximadamente 1.300 millones de US\$/año (MAGyP, 2011). Sin embargo, la competencia del aceite de girasol con aquellos provenientes de los cultivos de soja y palma sumado a la falta de diferenciación de calidad de estos aceites, ha llevado al cultivo de girasol a una situación desfavorable en comparación con estos cultivos (Escande, 2009).

Los principales productos que se obtienen del girasol son la harina y el aceite. La harina es utilizada en la industria de alimentos ya que contiene entre 40 y 50% de proteínas, lo cual la hace atractiva para la alimentación del ganado. El aceite es uno de los más beneficiosos para la salud por su alto contenido de grasas poliinsaturadas y se utiliza puro o en mezclas, para consumo directo y para fabricar margarinas. Los subproductos de la fabricación de aceite son utilizados para la alimentación animal como suplemento proteico en las raciones (Pascale y De la Fuente, 1992). Las semillas de girasol poseen otros usos: aceite para la industria, elaboración de productos cosméticos, detergentes, barnices, pintura y como combustible en ciertos países (Duke, 1983).

Descripción vegetal

El girasol es una planta herbácea, anual, perteneciente a la familia *Asteraceae*, de más de 1 m de alto, con flores reunidas en capítulos grandes; siendo las exteriores de color amarillas y las interiores de color café. Las hojas y el tallo son ásperos al tacto. Presenta una raíz principal pivotante de grandes dimensiones, pudiendo alcanzar en algunos casos 150 cm de longitud. Generalmente, las hojas inferiores son opuestas y las superiores alternas, las láminas foliares son deltoides-ovadas con los márgenes aserrados.

La “semilla” es en realidad un fruto seco denominado aquenio. Éste se caracteriza por ser oblongo-ovoide, algo comprimido, de 8 a 20 mm de longitud, 4 a 14 mm de ancho y entre 2 y 5 mm de espesor, de color grisáceo.

El aquenio se compone de la verdadera semilla y un pericarpo fibroso y duro (la “cáscara”) (Fig. 1). La semilla está formada por el eje embrionario y dos cotiledones carnosos, estando el eje embrionario situado en la zona apical más aguda; mientras que los cotiledones ocupan todo el resto del espacio interior del fruto. La cubierta seminal forma una película fina que recubre al embrión, asegurando la adherencia entre el pericarpo y la semilla (Fick, 1978).



Fig. 1. Aquenio de girasol. Se observa la semilla, la cubierta seminal y el pericarpo

El pericarpo de un fruto maduro de girasol consta de una epidermis, una hipodermis que junto con la capa de fitomelanina, forman un estrato oscuro, y una capa media que comprende 6-8 estratos de células esclerificadas en grado variable. Esta última se encuentra interrumpida a intervalos regulares por los radios, de naturaleza parenquimática. La estructura anatómica del pericarpo se define en pre-antesis. Durante los diez días posteriores a la antesis, éste acumula rápidamente materia seca a la vez que se produce la esclerificación en las células de la capa media. Los estratos internos del pericarpo, incluyendo los haces vasculares, son paulatinamente comprimidos por el desarrollo de la semilla (Lindström *et al.*, 2000) (Fig. 2).

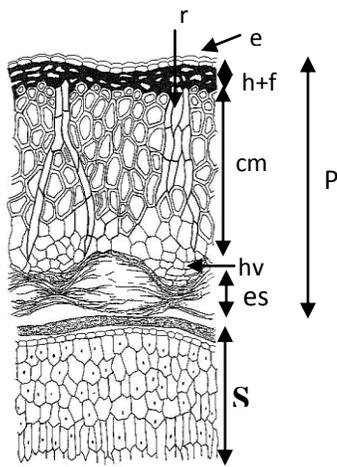


Fig. 2. Sección transversal del pericarpo (P) de girasol (*Helianthus annuus* L.) en madurez fisiológica. r: radio. e: epidermis. h+f: hipodermis más capa de fitomelanina. cm: capa media. hv: haz vascular. es: estratos internos del pericarpo comprimidos a la madurez del fruto. S: semilla.

La semilla contiene como sustancias de reserva lípidos (50%) y proteínas (9-20%) siendo el ácido linoleico el ácido graso mayoritario (Rondanini *et al.*, 2003; Mantese *et al.*, 2006). Por otro lado, la fracción proteica tiene la ventaja frente a otras oleaginosas de carecer de componentes antinutritivos o tóxicos (Rojo Hernández, 2005).

Dormición y su influencia en girasol

La dormición se define como la falla en las semillas maduras viables para germinar bajo condiciones ambientales favorables; siendo ésta una importante característica adaptativa que le permite a la semilla permanecer quiescente hasta que las condiciones de germinación y establecimiento de la plántula sean favorables (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La transición entre dormición y germinación representa una etapa crítica en el ciclo de vida de las plantas superiores. En girasol, la dormición está controlada tanto por el embrión como por la

cubierta seminal (Kelly *et al.*, 1992) y generalmente comprende un período de 30 a 40 días post-cosecha. Asimismo, se ha demostrado que la dormición presenta variabilidad genotípica (Maiti *et al.*, 2006) e inclusive dentro de un mismo genotipo dependiendo del origen y de las condiciones agro-ecológicas (Subrahmanyam *et al.*, 2002).

El estado de dormición puede ser eliminado mediante diferentes tratamientos tales como: estratificación de las semillas a bajas temperaturas, aplicación de compuestos nitrogenados (óxido nítrico, nitrato) y escarificación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein *et al.*, 2008).

El almacenamiento en condiciones secas durante un período prolongado es también otro de los mecanismos a través de los cuales las semillas pueden eliminar su dormición; permitiendo que éstas puedan germinar (Probert, 2000; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Este proceso implica cambios metabólicos y fisiológicos tanto en el embrión como en las cubiertas seminales (Leubner-Metzger, 2005; Bair *et al.*, 2006). En este sentido, los principales efectos del almacenamiento en seco de las semillas pueden ser agrupados en: ampliación del rango de temperatura para germinar (Oracz *et al.*, 2007), descenso en la sensibilidad y en los niveles endógenos de ácido abscísico (ABA), así como un aumento en la sensibilidad a giberelinas (GAs) o pérdida de sus requerimientos (Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Cadman *et al.*, 2006), pérdida de los requerimientos de luz de las semillas que no germinan en oscuridad (Derks y Karssen, 1993), incremento en la sensibilidad a la luz en semillas que no germinan aún en luz (Battla y Benech-Arnold, 2005), pérdida en los requerimientos de nitrato (Alboresi *et al.*, 2005) y acelera velocidad de germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Holdsworth *et al.*, 2008). En general, estudios realizados en relación al proceso de dormición han revelado una compleja interacción entre condiciones ambientales, reguladores del crecimiento y sensibilidad de las semillas a los mismos (Goggin *et al.*, 2009).

La regulación hormonal del crecimiento y desarrollo de las plantas es un proceso complejo. Numerosos trabajos han demostrado la acción simultánea de diferentes hormonas vegetales las cuales actúan promoviendo o inhibiendo un determinado proceso. Asimismo el metabolismo de las hormonas vegetales depende uno de otro, y un cambio en los niveles endógenos de una, eventualmente altera el contenido de las restantes (Preston *et al.*, 2009). Es bien conocido que ABA conjuntamente con GAs juegan un rol central en la modulación de la germinación y/o dormición (Feurtado y Kermode, 2007; Yamaguchi, 2008). Sin embargo, ambos procesos requieren de la interacción con otras hormonas tales como jasmonatos (JAs) y ácido salicílico (SA) (Xie *et al.*, 2007; Preston *et al.*, 2009; Dave *et al.*, 2011). Diferencias en los niveles endógenos hormonales como así también en el camino de transducción de las señales se

han observado entre semillas dormidas y aquellas que han sido sometidas a períodos de almacenamiento en seco (Millar *et al.*, 2006; Yano *et al.*, 2009).

La dormición de semillas de girasol representa un importante retraso para la siembra inmediata y conlleva dificultades en la comercialización de sus simientes. Asimismo, escasos son los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares y fisiológicos involucrados en la pérdida de dormición durante el almacenamiento en condiciones secas; como así también los cambios que ocurren en etapas tempranas del proceso de imbibición.

Jasmonatos (JAs): biosíntesis y funciones en las plantas

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 las oxilipinas.

JA es una ciclopentanona que posee una cadena pentenilo y una carboxílica. Entre los cuatro isómeros posibles, el enantiómero (-)-JA tiene la configuración absoluta (3R, 7R), siendo la forma (+)-7-iso-JA (3R, 7S) nativa y fisiológicamente activa (Fig. 3).

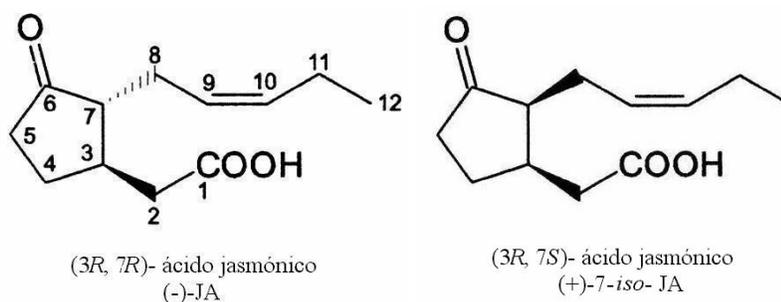


Fig. 3. Estructura química del ácido jasmónico (Wasternack y Parthier, 1997)

JA se origina a partir del ácido graso poliinsaturado α -ácido linolénico (α -LA), 18:3. En plantas, especialmente las membranas cloroplásticas, constituyen una fuente muy rica de LA esterificado en glicerolípidos y fosfolípidos. Actualmente se postula que la fosfolipasa A (PLA) participa en la reacción inicial para la generación de metabolitos de la vía lipoxigenasa (LOX) produciendo la liberación de LA. En *Arabidopsis thaliana*, la fuente de ácidos grasos para la biosíntesis de JAs proviene de dos vías: una hexadecanoica (16:3) a partir del galactolípidio monogalactosildiacilglicerol (MGDG) (Stelmach *et al.*, 2001), y otra octadecanoica (18:3) a partir del fosfolípido fosfatidilcolina (Ishiguro *et al.*, 2001).

El α -LA es sustrato de la enzima lipoxigenasa (LOX), la cual cataliza la inserción de oxígeno en el átomo de C-9 (9-LOX) ó C-13 (13-LOX), resultando en la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos. JA es sintetizado a través de la rama AOS de la vía 13-LOX. La oxigenación en el C-13 del LA por la 13-LOX conduce a la formación de 13-hidroperóxido de ácido linolénico (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-epoxioctadecatrieno), el cual en presencia de una óxido de aleno ciclasa (AOC) origina el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA). OPDA, primer compuesto cíclico producido, es reducido por OPDA reductasas 3 (OPR3) al ácido 3-oxo-pentenilo-ciclopentano-octanoico (OPC-8:0), que luego de tres ciclos de beta-oxidación origina (+)-7-iso-ácido jasmónico. La beta-oxidación es catalizada por tres proteínas: acil-CoA oxidasa (ACX), la proteína multifuncional (MFP) y la L-3-ketoacil-CoA tiasa (KAT). (+)-7-iso-ácido jasmónico es convertido rápidamente a su estereoisómero más estable, (-) JA, y posteriormente es metabolizado a diferentes miembros de la familia de los jasmonatos (Wasternack y Kombrink, 2010). Entre ellos, podemos mencionar: JA conjugado con aminoácidos a través de una adenilación en el ácido carboxílico de la cadena lateral, catabolizado por JA-amino sintetasa (JAR1) (Staswick y Tiryaki, 2004), metilación de JA por una metil transferasa específica (Seo *et al.*, 2001), hidroxilación en el C-11 o C-12 de la cadena pentenil y la subsiguiente O-glicosilación (Swiatek *et al.*, 2004) o sulfonación (Gidda *et al.*, 2003), descarboxilación de JA a cis-jasmone (Koch *et al.*, 1997). En adición, a partir de JA se puede originar ácido cucúrbico por reducción del grupo cetona del anillo ciclopentanona (Sembdner y Parthier, 1993), así como jasmonoil-1- β -glucosa, jasmonoil-1- β -gentiobiosa y hidroxijasmonil-1- β -glucosa (Swiatek *et al.*, 2004). Asimismo, JA se puede conjugar con el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor de etileno (Staswick y Tiryaki, 2004).

Recientemente se ha confirmado que OPDA puede conjugarse con glutatión (GSH) y de este modo ser transportado a vacuola regulando así la disponibilidad de JAs en los tejidos vegetales (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2010). En cuanto a la localización celular de la biosíntesis y metabolismo de JA se ha establecido que la misma ocurre en tres compartimentos celulares: en cloroplasto, donde OPDA es sintetizado, en peroxisoma, donde tiene lugar la reducción de OPDA por la OPR3, y los pasos de beta-oxidación, y en citoplasma, donde ocurren las diferentes modificaciones de JA (Schaller *et al.*, 2005) (Fig. 4).

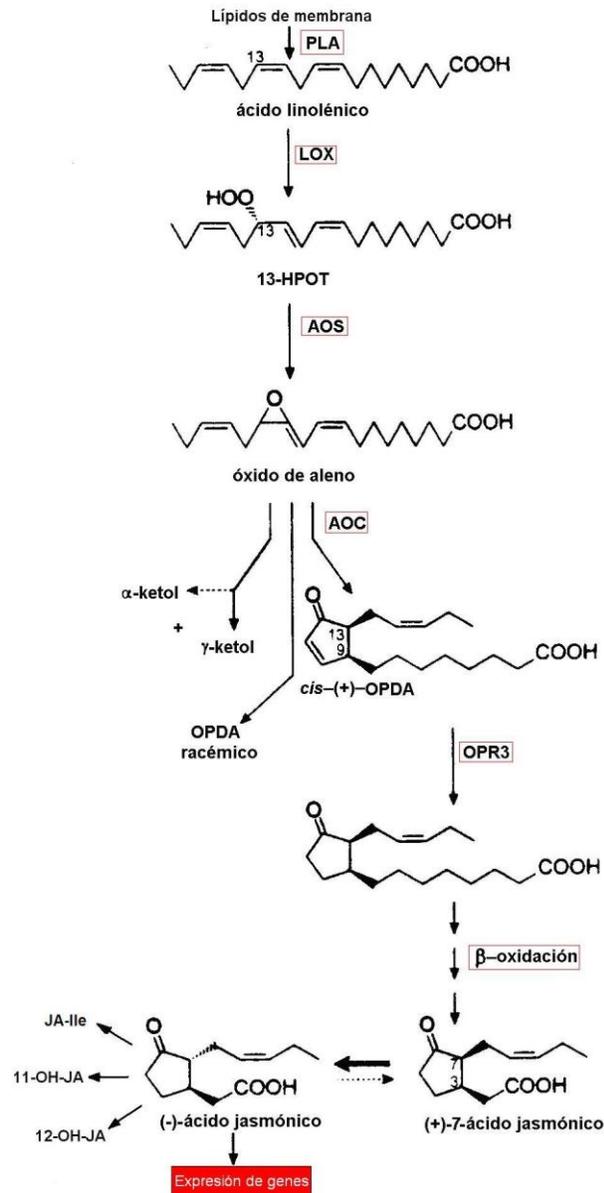


Fig. 4. Biosíntesis de JA (Adaptado de Stenzel *et al.*, 2003)

En cuanto a las funciones de los JAs, en la década del '80 se comenzaron a describir numerosos efectos fisiológicos, tales como inhibición del crecimiento de la raíz (Wasternack, 2007) y promoción de la senescencia (Van Der Graaf *et al.*, 2006). Posteriormente, los JAs fueron propuestos como moléculas señal que participan en las respuestas de las plantas a una gran variedad de factores bióticos y abióticos, así como en diversos procesos del desarrollo (Wasternack y Hause, 2002). En este sentido, una extensa bibliografía establece que los JAs son

requeridos para la dehiscencia de la antera y el desarrollo del polen (Stintzi y Browse, 2000); como así también ha sido documentada su participación en respuesta al ataque de herbívoros (Howe, 2005), daño mecánico (Reymond *et al.*, 2000), estrés osmótico (Kramell *et al.*, 2000), estrés salino (Reginato *et al.*, 2012), frío (Garbero *et al.*, 2010) y en respuesta a patógenos (Pozo *et al.*, 2005).

Numerosas respuestas de las plantas a distintos tipos de estrés conducen al aumento en los niveles de JAs y de su precursor OPDA, seguido por cambios en la expresión de genes. Inclusive, se detectó que algunos de ellos codifican para enzimas de su propia biosíntesis (Seo *et al.*, 2001; Böttcher y Pollmann, 2009), indicando de este modo un control positivo de la biosíntesis de JAs. Además, se ha demostrado que el estrés mecánico ocasionado por heridas induce la síntesis de JA y JA-Ile, lo cual conlleva a la activación de la expresión temprana de genes (Koo *et al.*, 2009).

Ácido Salicílico (SA): biosíntesis y funciones en las plantas

El ácido salicílico es un metabolito secundario producido por una amplia variedad de organismos procariontas y eucariotas, incluyendo las plantas. Químicamente, pertenece a un grupo de compuestos fenólicos que poseen un anillo aromático con un grupo hidroxilo o su derivado funcional (Fig. 5).

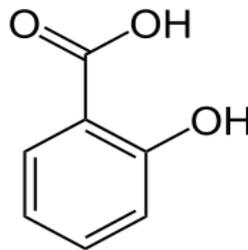


Fig. 5. Estructura química del ácido salicílico (Delaney, 2004)

En plantas, se han identificado dos vías enzimáticas para la biosíntesis de SA (Dempsey *et al.*, 2011). Una de ellas es la vía mediada por la fenilalanina amonioliasa (PAL) que ocurre en el citoplasma; la otra está mediada por la isocorismato sintasa (ICS) y tiene lugar en el cloroplasto. Ambas vías se originan del metabolito primario corismato, el cual es un intermediario de la vía fenilpropanoide.

Estudios bioquímicos realizados en la década del '60 sugirieron dos posibles rutas a partir de la fenilalanina que difieren en la etapa de hidroxilación del anillo aromático. La etapa inicial es

común a ambas vías y consiste en la conversión de fenilalanina a ácido trans-cinámico y NH_3 por medio de la enzima PAL (Raes *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2004). Posteriormente, el ácido trans-cinámico es hidroxilado para formar *O*-cumárico seguido por la oxidación de la cadena lateral para producir SA. Alternativamente, la cadena lateral del ácido trans-cinámico puede ser oxidada para dar ácido benzoico, que luego se hidroliza para producir SA. La etapa de hidroxilación de ácido benzoico a SA es catalizada por una 2-hidroxilasa (BA2H), enzima detectada en plantas incluyendo tabaco y arroz (Sawada *et al.*, 2006). La diferencia entre estas dos rutas está determinada por la hidroxilación del anillo aromático antes o después de las reacciones de acortamiento de la cadena. En algunas especies vegetales tales como girasol, tabaco, arroz, papa, pepino, y guisante (Silverman *et al.*, 1995; Sticher *et al.*, 1997) SA se forma principalmente a partir de ácido benzoico; mientras que otras especies tales como *Primula acaulis* y *Gaultheria procumbens* pueden también sintetizar SA a través de la vía de *O*-cumárico (El-Basyouni *et al.*, 1964).

Algunas bacterias pueden sintetizar SA a partir de corismato a través de dos reacciones catalizadas por ICS y piruvato liasa isocorismato (IPL). La sobreexpresión de estas dos enzimas bacterianas en plantas produce acumulación de SA, lo que indica que también las plantas tienen la capacidad de sintetizar SA a partir de corismato (Serino *et al.*, 1995). Estudios genéticos confirmaron la presencia de este mecanismo de biosíntesis de SA en *Arabidopsis* (Wildermuth *et al.*, 2001); de hecho, los genes *ICS1* y *ICS2* que codifican para una isocorismato sintasa han sido detectados en el genoma de *Arabidopsis* (Garcion *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado que la vía de ICS es activa en tomate y en tabaco (Uppalapati *et al.*, 2007; Catinot *et al.*, 2008). Sin embargo, en plantas aún no está claro cómo el isocorismato, producto de ICS, es convertido a SA (An y Mou, 2011), ya que no se han clonados genes que codifiquen para la enzima IPL (Chen *et al.*, 2009).

Una vez sintetizado, SA puede sufrir una serie de modificaciones químicas que incluyen: glucosilación, lo que resulta en la formación de SA 2-*O*- β -D-glucósido (SAG) o éster de glucosa salicilato (SEG) (Dean y Delaney, 2008), metilación con la consiguiente formación de metil salicílico (MeSA) o su forma 2-*O*- β -D-glucósido (MeSAG) (Song *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011) y conjugación con aminoácidos tales como aspartato (Zhang *et al.*, 2007) (Fig. 6). Así mismo, Baek *et al.* (2010) reportaron que SA puede sufrir sulfonación. Por último, mediante reacciones no enzimáticas SA puede ser convertido a dos dihidrobenzoatos: 2,3-DHBA y 2,5-DHBA (An y Mou, 2011).

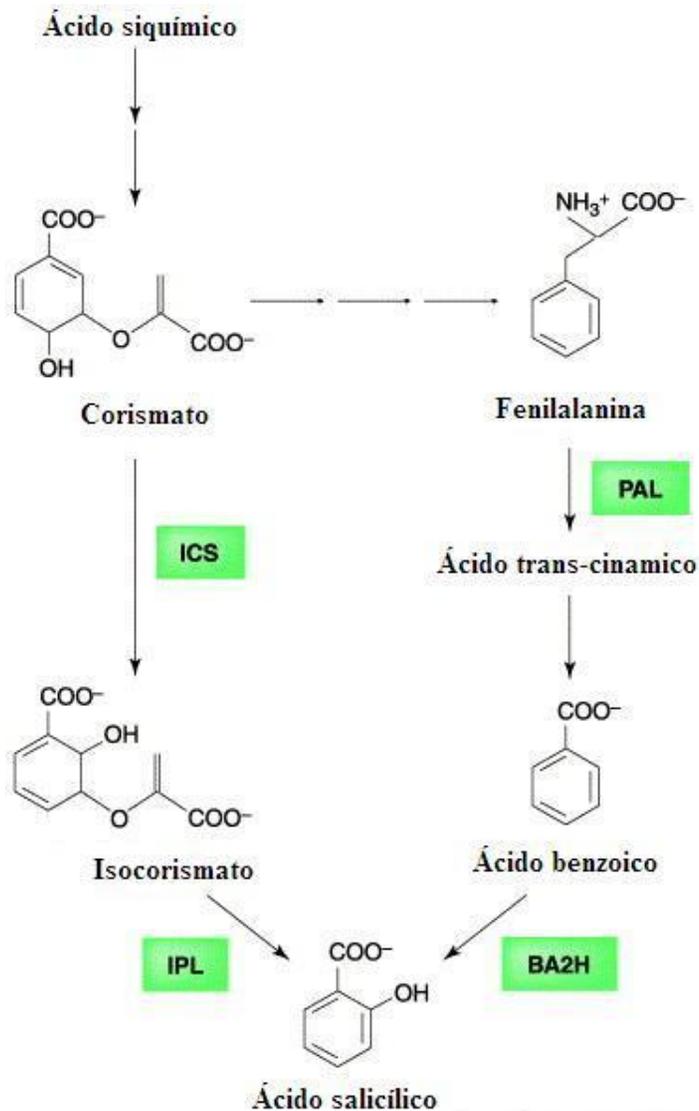


Fig. 6. Biosíntesis de SA (Adaptado de Shah, 2003)

En plantas, la aplicación exógena de SA o sus derivados afecta diversos procesos, tales como termogénesis (Raskin *et al.*, 1987), germinación de semillas (Rajou *et al.*, 2006), establecimiento de plántulas (Alonso-Ramírez *et al.*, 2009), respiración (Norman *et al.*, 2004), cierre de estomas (Lee, 1998), termo-tolerancia (Clarke *et al.*, 2004) y nodulación (Stacey *et al.*, 2006). Por otro lado, estudios genéticos con mutantes de *Arabidopsis* sugieren que SA está implicado en la modulación del crecimiento celular (Rate *et al.*, 1999), el desarrollo de tricomas (Traw y Bergelson, 2003) y la senescencia de hojas (Morris *et al.*, 2000). No obstante, su efecto sobre algunos de estos procesos puede ser indirecto, ya que SA interacciona con otras fitohormonas (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Pieterse *et al.*, 2009).

El rol más estudiado de SA es como molécula de señalización en la respuesta inmune de la planta (Vlot *et al.*, 2009). Dicha hormona parece jugar un papel esencial en la señalización que conduce a la activación de genes que codifican para proteínas relacionadas a patogénesis (PR), en el establecimiento de la respuesta hipersensible (HR) considerada como una muerte celular programada que se desarrolla para delimitar el área de infección de un patógeno, así como en la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Durner *et al.*, 1997). Estudios realizados en varias especies vegetales han demostrado que la infección por patógenos conduce a una acumulación de SA no sólo en las hojas infectadas, sino también en el resto de la planta lo cual conduce al desarrollo de SAR (Métraux *et al.*, 1990).

Efectos de JAs y SA en la germinación y dormición

JAs y SA regulan la germinación de las semillas; sin embargo, se desconoce en gran medida cómo influyen estas hormonas en dicho proceso. En tal sentido, diferentes trabajos han mostrado resultados contradictorios, con algunos efectos promotores y otros inhibidores de la germinación (Lee y Park, 2010).

Preston *et al.* (2009) estudiando semillas de *Arabidopsis* con diferente grado de dormición observaron que los niveles endógenos de JA y su derivado conjugado con isoleucina (JA-Ile) fueron marcadamente diferentes tanto en semillas secas y embebidas de los ecotipos Col (no dormido) y Cvi (dormido). Por otro lado, se ha reportado que tanto JA como su forma metilada ME-JA son capaces de inhibir la germinación en *Brassica napus*, *Linum usitatissimum*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis* y *Helianthus annuus* (Miersch *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2009). Recientemente, en semillas de *Arabidopsis* también se ha demostrado que OPDA es más efectivo que JA como inhibidor de la germinación; actuando conjuntamente con ABA en dicho proceso (Dave *et al.*, 2011).

En relación a SA, resultados contradictorios se han informado respecto a su rol en la germinación de semillas. Por ejemplo, SA inhibe la germinación en maíz (Guan y Scandalios, 1995); mientras que incrementa el vigor de las semillas de trigo y arveja (McCue *et al.*, 2000; Shakirova *et al.*, 2003). Rajou *et al.* (2006) demostraron que SA induce la germinación de semillas bajo condiciones de estrés salino. Cuando SA fue analizado durante el proceso de imbibición de semillas de *Arabidopsis* se observó una disminución gradual en sus niveles endógenos (Preston *et al.*, 2009).

HIPÓTESIS

Los niveles endógenos de JAs y SA difieren cuantitativamente en pericarpo de aquenios de girasol con dormición a cosecha (línea B123) y sin dormición a cosecha (línea B91) luego de su almacenamiento bajo diferentes condiciones.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los niveles endógenos de JAs y SA en pericarpo de aquenios secos y embebidos luego de su almacenamiento en diferentes condiciones, y correlacionarlos con la capacidad germinativa de los mismos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles basales de JAs (OPDA, JA, JA-Ile) y SA en pericarpo de aquenios secos de girasol de las líneas endocriadas B123 y B91 luego de su almacenamiento en seco.
2. Cuantificar los niveles endógenos de JAs (OPDA y JA) y SA durante el proceso de imbibición en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas endocriadas B123 y B91 luego de su almacenamiento en seco.
3. Correlacionar la capacidad germinativa con los niveles hormonales endógenos de los aquenios de ambas líneas luego de su almacenamiento en seco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Aquenios de girasol de las líneas endocriadas B123 (con dormición a cosecha) y B91 (sin dormición a cosecha) provistos por EEA-INTA Manfredi se utilizaron para la realización de los ensayos programados.

Condiciones de almacenamiento

Al momento de cosecha, un grupo de aquenios (500) de ambas líneas fueron almacenados a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, mientras que otra parte se conservó a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C}\pm 1$) por el término de 33 días.

Evaluación del porcentaje de germinación

Veinticinco aquenios por repetición se colocaron a germinar entre papel húmedo bajo condiciones ambientales generadas por una cámara de crecimiento programada con 8 h de oscuridad a 20°C y 70% de HR y 16 h de luz ($130\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) a 28°C y 65% de HR. El recuento de germinación se realizó a los 4 días post-siembra (energía germinativa) y a los 10 días post-siembra (poder germinativo). Se consideraron germinados aquellos aquenios que presentaron emergencia de la radícula. Los datos de energía germinativa y poder germinativo fueron referidos respecto al % de germinación de los aquenios no dormidos (porcentajes relativos).

Obtención de pericarpo para las determinaciones hormonales

Aquenios secos: Veinticinco aquenios (por repetición) de las líneas B123 y B91 fueron separados en embrión (eje embrionario + cotiledones) y pericarpo. Posteriormente el pericarpo se congeló en N_2 , liofilizó y conservó a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Las experiencias se realizaron por cuadruplicado.

Aquenios embebidos: Veinticinco aquenios (por repetición) de las líneas B123 y B91 provenientes de distintas condiciones de almacenamiento (tiempo post-cosecha: 0 y 33 días y temperatura: $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) se sembraron en bandejas de plástico entre papel húmedo y se colocaron a germinar en condiciones ambientales generadas por una cámara de crecimiento

programada con las condiciones antes mencionadas. A las 0, 3, 6, 12, 18 y 24 hs de imbibición se congelaron en N₂, liofilizaron y conservaron a -20°C±1°C hasta su uso. Posteriormente se separó el pericarpo para la realización de las determinaciones hormonales. Las experiencias se realizaron por cuadruplicado.

Extracción y cuantificación de hormonas

La extracción y purificación de las hormonas vegetales (JAs y SA) se llevó a cabo según protocolo de Durgbanshi *et al.* (2005) con modificaciones. Para ello, 200 mg de peso seco de pericarpo de achenios secos y germinantes se trituraron en mortero con N₂ líquido y 5 ml de agua deionizada (solvente de extracción). Los extractos se transvasaron a tubos Falcon de 50 ml. Como estándares internos se adicionaron 50 ng de (²H₅)-OPDA, (²H₆)-JA, (²H₃)-JA-Ile y (²H₆)-SA. Cada muestra se pasó por ultraturrax durante 40 seg para completar la homogeneización y facilitar la 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, se filtraron a través de un filtro de jeringa (velocidad de flujo menor a 1ml/min.) en cámara de vacío y se secaron a temperatura ambiente en SpeedVac. La cuantificación se realizó mediante Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas Tándem (LC-ESI/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). Se utilizó una columna Resteck C18 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 H₂O (solvente B)/ MeOH (solvente A) a una velocidad de flujo de 200 µl min⁻¹. La identificación y cuantificación hormonal se realizó mediante un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo. Los análisis se realizaron utilizando la fuente de electrospray en modo de ionización negativo. La cuantificación se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples). La adquisición de datos por MRM se realizó por monitoreo de iones parentales y transiciones para OPDA, JA, JA-Ile, y SA, y [²H₅]-OPDA, [²H₆]-JA, [²H₃]-JA-Ile y [²H₄]-SA (estándares internos), respectivamente.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se usó un diseño experimental en bloques completos al azar (DBCA) con arreglo factorial y 4 repeticiones temporales. Los datos fueron analizados mediante Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA). Se empleó a posteriori un test de Rangos Múltiples (LSD de Fisher; $p \leq 0.05$). El software empleado fue Statgraphics Plus, versión 3 (Manugistics, 1997).

RESULTADOS

Energía y poder germinativo

La energía germinativa relativa (EGR) de los aquenios de la línea B123 mostró diferencias significativas entre las distintas condiciones de almacenamiento. Al tiempo 0 post-cosecha, estos aquenios no germinaron. Los aquenios almacenados durante 33 días a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ mostraron una EGR similar a los aquenios de la línea B91 (aproximadamente 100%), mientras que en aquellos almacenados a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ la EGR fue de aproximadamente 8% (Fig. 7). El poder germinativo relativo (PGR) también evidenció diferencias significativas entre las condiciones de almacenamiento, con resultados similares a los de EGR (Fig. 8). La EGR y PGR de los aquenios de la línea B91 no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (Figs. 7 y 8).

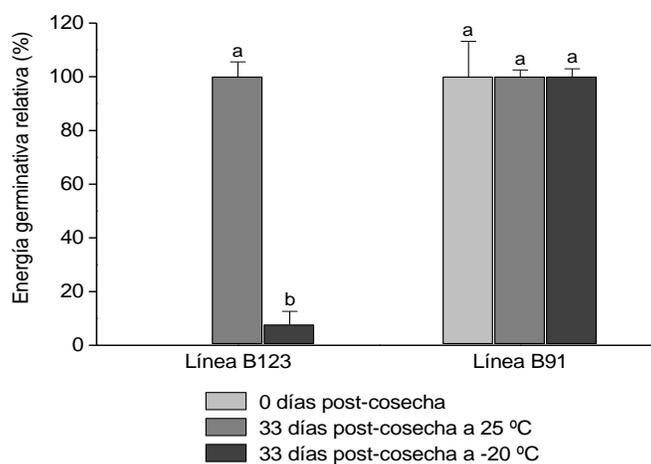


Fig. 7. Energía germinativa relativa de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento ($n=4 \pm \text{SE}$).

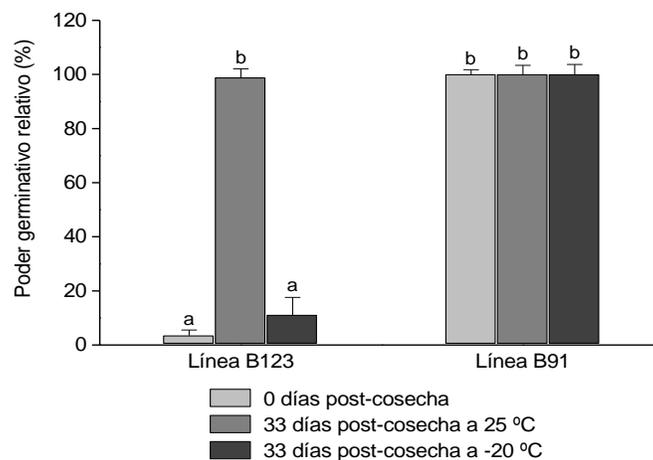


Fig. 8. Poder germinativo relativo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento ($n=4 \pm SE$).

Niveles hormonales endógenos en pericarpo de aquenios secos

OPDA, JA, JA-Ile y SA fueron detectados en pericarpo de aquenios secos de las líneas B123 y B91. SA presentó los niveles endógenos más altos mientras que JA-Ile los más bajos (Figs. 9, 10 y 11).

A los 0 días post-cosecha, OPDA y SA presentaron los mayores niveles endógenos. En la línea B91 se observaron menores niveles de ambos compuestos respecto a la línea B123. Por el contrario, JA y JA-Ile no presentaron diferencias significativas entre líneas (Fig. 9).

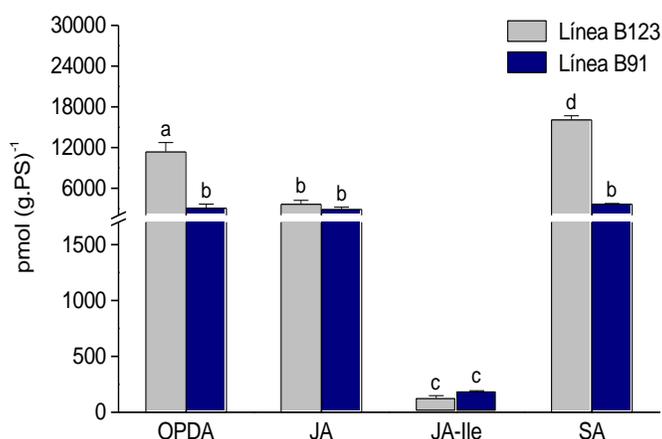


Fig. 9. Niveles endógenos de OPDA, JA, JA-Ile y SA (pmol.g PS⁻¹) en pericarpio de aquenios secos de girasol de las líneas B123 y B91 al momento de cosecha (0 días post-cosecha) (n=4 ± SE).

A los 33 días post-cosecha a 25°C±1°C, el compuesto mayoritario fue SA en la línea B123 (27277,75 pmol.g PS⁻¹) mientras que JA y JA-Ile no mostraron diferencias significativas entre líneas (Fig. 10). Un incremento en los niveles de SA (1,7 veces) y una disminución de OPDA (1,5 veces) se observó en la línea B123 respecto a los 0 días post-cosecha (Figs. 9 y 10).

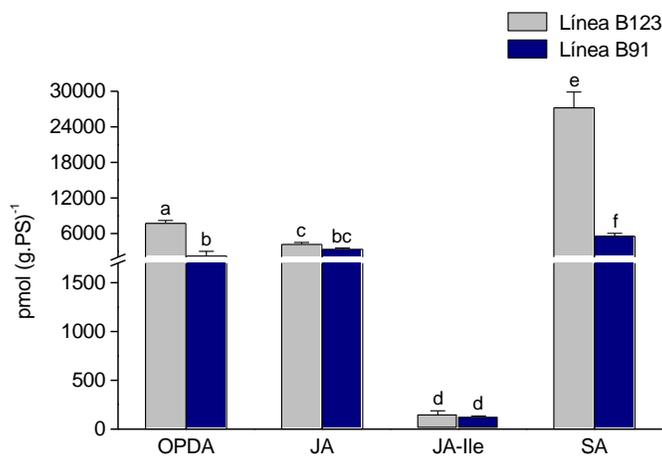


Fig. 10. Niveles endógenos de OPDA, JA, JA-Ile y SA (pmol.g PS⁻¹) en pericarpio de aquenios secos de girasol de las líneas B123 y B91 a los 33 días post-cosecha almacenados a 25°C±1°C (n=4 ± SE).

A los 33 días de almacenamiento a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, SA y JA fueron los compuestos más abundantes en ambas líneas (Fig. 11). Una disminución en los niveles de OPDA y JA se registró en ambas líneas en relación a los 0 días post-cosecha (Figs. 9 y 11). Con respecto al almacenamiento a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, los niveles de OPDA y JA fueron considerablemente menores (Figs. 10 y 11).

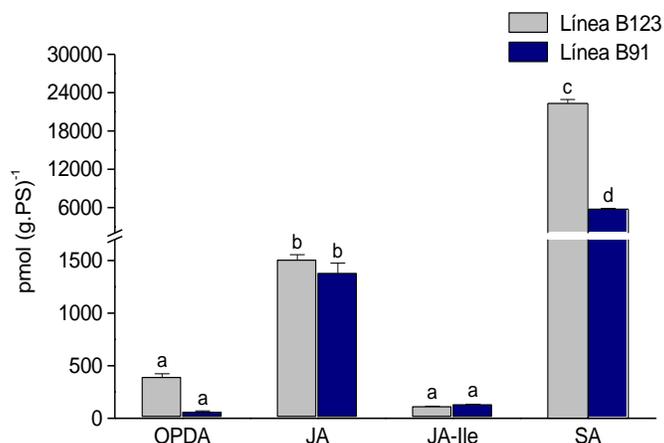


Fig. 11. Niveles endógenos de OPDA, JA, JA-Ile y SA (pmol.g PS^{-1}) en pericarp de aquenios secos de girasol de las líneas B123 y B91 a los 33 días post-cosecha almacenados a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ($n=4 \pm \text{SE}$).

Niveles hormonales endógenos en pericarp de aquenios embebidos

A los 0 días post-cosecha, el nivel de OPDA en pericarp mostró un pico a las 6 horas de imbibición en ambas líneas. Posteriormente, disminuyó hasta las 24 horas en la línea B123 mientras que en la línea B91 sus niveles fluctuaron. Los niveles de OPDA fueron superiores en la línea B123 en todos los tiempos analizados (Fig. 12).

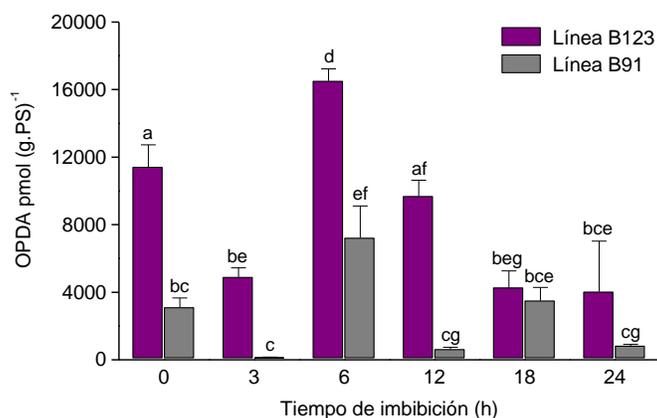


Fig. 12. Niveles endógenos de OPDA (pmol.g PS^{-1}) en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha ($n=4 \pm \text{SE}$).

A los 33 días post-cosecha a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, los niveles más altos de OPDA se cuantificaron a las 0, 3 y 24 horas de imbibición en la línea B123, mostrando diferencias significativas respecto a la línea B91. En la línea B91, OPDA disminuyó desde las 0 a las 6 horas, posteriormente mostró un pico de acumulación a las 12 horas, y nuevamente disminuyó hacia el final del experimento (Fig. 13). En general, una disminución de OPDA se observó en todos los tiempos de imbibición respecto a los 0 días post-cosecha en ambas líneas (Figs. 12 y 13).

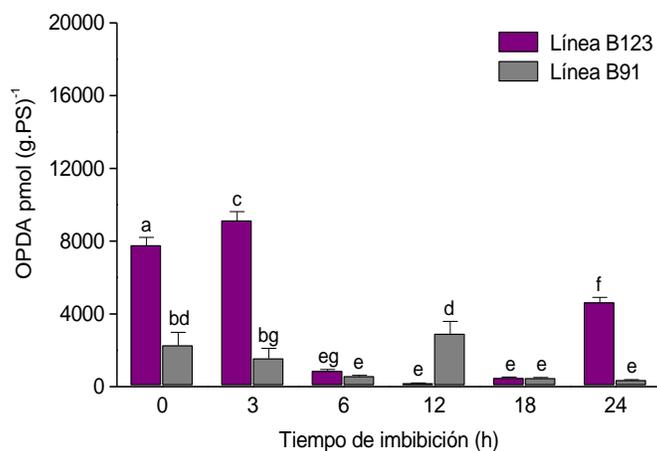


Fig. 13. Niveles endógenos de OPDA (pmol.g PS^{-1}) durante la imbibición en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 33 días post-cosecha ($n=4 \pm \text{SE}$).

A los 33 días de almacenamiento a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ OPDA disminuyó a las 3 y 6 horas de imbibición en la línea B123; subsecuentemente, aumentó y se mantuvo constante hasta el final del experimento (24 horas). En la línea B91 los niveles más bajos se cuantificaron a las 0 horas de imbibición, detectándose un pico a las 12 horas (Fig. 14). A esta temperatura de almacenamiento, OPDA aumentó comparado a las otras condiciones experimentales analizadas (Figs. 12, 13 y 14).

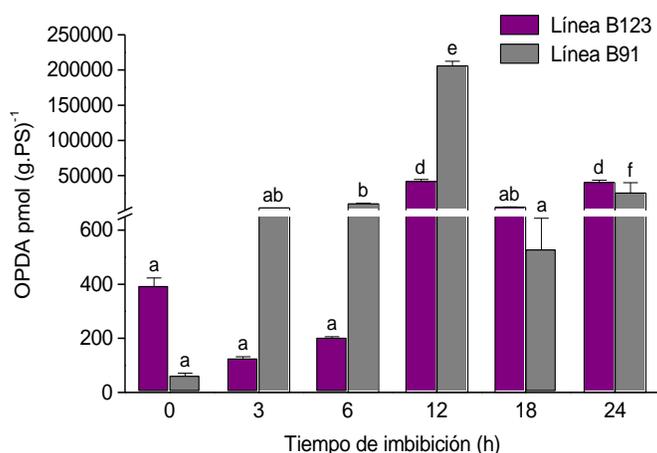


Fig. 14. Niveles endógenos de OPDA (pmol.g PS^{-1}) durante la imbibición en pericarpo de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 33 días post-cosecha ($n=4 \pm \text{SE}$).

Respecto a JA, a los 0 días post-cosecha en la línea B123 se observó un pico de acumulación a las 3 horas de imbibición, y luego una disminución gradual y sostenida hasta las 24 horas. En la línea B91, JA disminuyó a las 3 horas y luego se mantuvo relativamente estable durante el transcurso de la imbibición. Cabe destacar que la línea B91 presentó niveles significativamente inferiores a los de la línea B123 en todos los tiempos (Fig. 15).

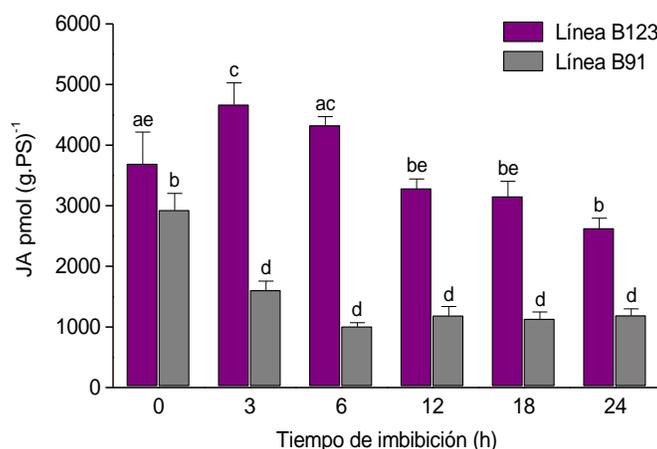


Fig. 15. Niveles endógenos de JA (pmol.g PS⁻¹) en pericarpio de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha (n=4 ± SE).

A los 33 días post-cosecha a 25°C±1°C, JA disminuyó desde las 0 hasta las 24 horas de imbibición en la línea B123 (Fig. 16). En la línea B91 una tendencia de acumulación similar se observó en relación a los 0 días post-cosecha. En general, niveles relativamente más bajos de JA se observaron en todos los tiempos de imbibición respecto a los 0 días post-cosecha en ambas líneas (Figs. 15 y 16).

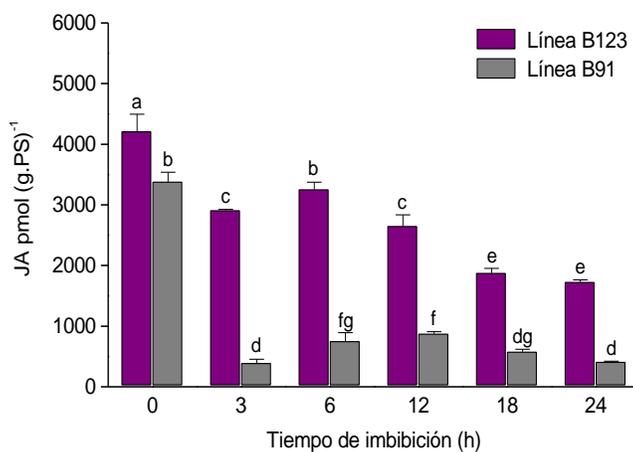


Fig. 16. Niveles endógenos de JA (pmol.g PS⁻¹) durante la imbibición en pericarpio de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a 25°C±1°C por 33 días post-cosecha (n=4 ± SE).

A los 33 días post-cosecha a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, los niveles de JA fluctuaron a lo largo del experimento en ambas líneas. En la línea B123, este compuesto presentó mayor acumulación a las 3 y 18 horas de imbibición; mientras que en B91, los niveles más altos se observaron a las 0 y 6 horas de imbibición (Fig. 17). En general, menores niveles de JA y una cinética de acumulación diferente se detectó en ambas líneas respecto a las otras condiciones experimentales analizadas (Figs. 15, 16 y 17).

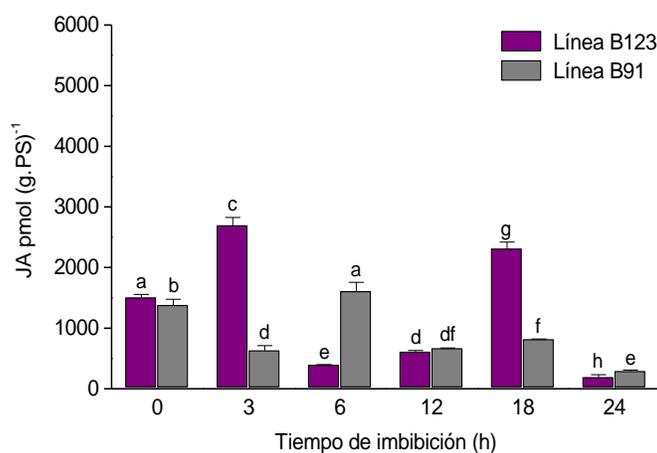


Fig. 17. Niveles endógenos de JA (pmol.g PS^{-1}) durante la imbibición en pericarpio de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 33 días post-cosecha ($n=4 \pm \text{SE}$).

Respecto a los niveles de SA, en la línea B123, disminuyeron 3 veces a partir de las 3 horas de imbibición y permanecieron relativamente constantes hasta el final del experimento a los 0 días post-cosecha. En la línea B91, los niveles de SA fueron bajos y similares en todos los tiempos de imbibición, siendo significativamente inferiores a los de la línea B123 (Fig. 18).

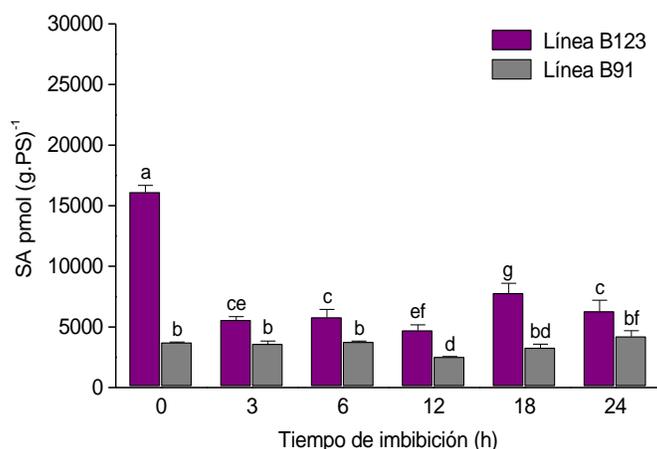


Fig. 18. Niveles endógenos de SA (pmol.g PS⁻¹) en pericarpio de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha (n=4 ± SE).

A los 33 días post-cosecha a 25°C±1°C, en la línea B123 se detectó una reducción en el nivel de SA (5 veces) a las 6 horas, permaneciendo relativamente estable hasta las 24 horas de imbibición. Por el contrario, en la línea B91 SA disminuyó a partir de las 3 horas y luego aumentó levemente a las 18 horas de imbibición (Fig. 19). Al comparar 0 y 33 días post-cosecha a 25°C±1°C, la cinética de acumulación de SA fue similar para ambas líneas (Figs. 18 y 19).

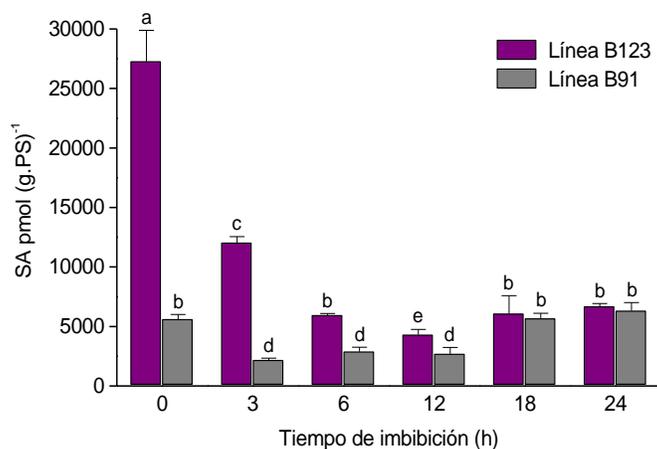


Fig. 19. Niveles endógenos de SA (pmol.g PS⁻¹) durante la imbibición en pericarpio de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a 25°C±1°C por 33 días post-cosecha (n=4 ± SE).

A los 33 días post-cosecha a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, en la línea B91 el nivel de SA mostró un pico de acumulación a las 18 horas de imbibición; en contraposición, en la línea B123 una acumulación ($\sim 22000 \text{ pmol.g PS}^{-1}$) se registró a las 0 horas de imbibición (Fig. 20). Posterior al almacenamiento a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, SA presentó una dinámica de acumulación similar a la de 0 y 33 días post-cosecha a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Figs. 18, 19 y 20).

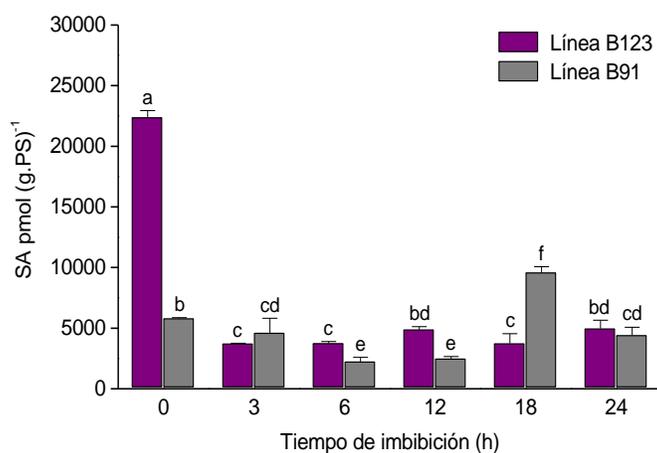


Fig. 20. Niveles endógenos de SA (pmol.g PS^{-1}) durante la imbibición en pericarp de aquenios de girasol de las líneas B123 y B91 almacenados a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 33 días post-cosecha ($n=4 \pm \text{SE}$).

Análisis de correlación entre porcentaje de germinación y niveles hormonales endógenos de la línea B123

Una correlación positiva fue hallada entre porcentaje de germinación y niveles endógenos de JA en pericarp ($r: 0,70; p<0,05$) (Tabla 1).

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
REGRESIÓN	7568,38	1	6,87	0,0344
RESIDUO	7712,5	7		
TOTAL	15280,9	8		

r^2 : 0,49

Tabla 1. Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de JA ($p < 0.05$).

Una correlación positiva fue hallada entre porcentaje de germinación y niveles endógenos de JA-Ile en pericarpo (r : 0,65; $p < 0,10$) (Tabla 2).

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
REGRESIÓN	6520,27	1	5,21	0,0564
RESIDUO	8760,62	7		
TOTAL	15280,9	8		

r^2 : 0,42

Tabla 2. Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de JA-Ile ($p < 0.10$).

Una correlación positiva fue hallada entre porcentaje de germinación y niveles endógenos de SA en pericarpo (r: 0,80; p<0,01) (Tabla 3).

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	P
REGRESIÓN	10048,8	1	13,44	0,0080
RESIDUO	5232,09	7		
TOTAL	15280,9	8		

r^2 : 0,65

Tabla 3. Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de SA (p<0.01).

Análisis de correlación entre porcentaje de germinación y niveles hormonales endógenos de la línea B91

Una correlación positiva fue hallada entre porcentaje de germinación y niveles endógenos de JA-Ile en pericarpo (r: 0,95; p<0,01) (Tabla 4).

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	P
REGRESIÓN	1792,49	1	68,04	0,0001
RESIDUO	184,4	7		
TOTAL	1976,89	8		

r^2 : 0,90

Tabla 4. Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de JA-Ile ($p < 0,01$).

Una correlación positiva fue hallada entre porcentaje de germinación y niveles endógenos de SA en pericarpo (r : 0,74; $p < 0,05$) (Tabla 5).

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	P
REGRESIÓN	1086,07	1	8,53	0,0223
RESIDUO	890,822	7		
TOTAL	1976,89	8		

r^2 : 0,54

Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de SA ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El almacenamiento bajo condiciones secas es un proceso por el cual las semillas maduras recién cosechadas pueden perder su estado de dormición, es decir, adquieren la capacidad de germinar (Probert, 2000). La temperatura es un factor ambiental fundamental que afecta el estado de dormición durante el almacenamiento en seco. En la mayoría de las especies, el estado de dormición se revierte rápidamente con el aumento de la temperatura durante el almacenamiento (Brown *et al.*, 2004). En girasol, la temperatura en combinación con la humedad relativa inciden fuertemente en la pérdida de dormición durante el almacenamiento en seco (Bazin *et al.*, 2011). Respecto a este tema, los resultados demostraron que a una temperatura de almacenamiento de 25°C los aquenios de girasol de la línea B123 son capaces de perder su dormición y alcanzar porcentajes de germinación similares a aquellos no dormidos; esta temperatura se correspondería con la presente en el momento post-cosecha. De este modo la temperatura afectaría la transición entre el estado dormido y no dormido en aquenios de la línea B123. En concordancia con estos resultados, Oracz *et al.* (2008) reportaron que el almacenamiento a 20°C rompe dormición en girasol. Por otro lado, en este trabajo el almacenamiento a -20°C permitió mantener la dormición de aquenios de girasol de la línea B123. En concordancia, otros autores han informado que semillas de girasol almacenadas entre -15°C y -30°C mantienen la dormición (Oracz *et al.*, 2008; Bazin *et al.*, 2011). En el mismo sentido, granos de cebada mantuvieron su grado de dormición cuando fueron almacenados a -20°C (Leymarie *et al.*, 2008).

El pericarpo ejerce un complejo efecto sobre la dormición y germinación de la semilla como resultado de diversos factores físicos y químicos (Xiao *et al.*, 2009). En este sentido, se ha reportado que obstruye la absorción de agua, produce inhibidores químicos, impide la eliminación de inhibidores de la semilla e inhibe la emergencia radicular (Ogawa y Iwabuchi, 2001; Bradford y Nonogaki, 2007). Asimismo, algunos estudios concluyeron que la presencia del pericarpo reduce la tasa de desecación de la semilla, especialmente en años secos (Maruta *et al.*, 1997; Chacón y Bustamante, 2001). En este estudio se demostró que los diferentes perfiles hormonales cuantificados en el pericarpo podrían participar en el control de la germinación y dormición de los aquenios de girasol, debido a que los mismos difieren entre las líneas en estudio con grado de dormición contrastante.

El proceso por el cual la semilla seca madura pierde la condición de dormida luego de un período de almacenamiento en condiciones secas es llamado “after-ripening”. Durante este proceso y la posterior imbibición, tanto señales genéticas como ambientales se integran para

determinar el potencial de germinación de la semilla. Estudios han reportado que cambios en los transcritos y proteínas ocurren en la semilla seca durante el almacenamiento y que éstos podrían estar relacionados con la liberación de la dormición (Holdsworth *et al.*, 2008).

Las fitohormonas son algunos de los factores químicos que regulan la germinación y la dormición de la semilla. Las hormonas que se encuentran en el pericarpo son provistas por la planta madre durante la maduración de la semilla o potencialmente son extruídas desde el embrión hacia el pericarpo. Se ha demostrado que el almacenamiento en condiciones secas modifica en semillas de *Arabidopsis* los niveles endógenos de varias hormonas tales como, ABA, GA₄, JA, isopentenil adenina y SA (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). En este estudio se han encontrado perfiles hormonales diferentes entre las líneas endocriadas B123 (con dormición a cosecha) y B91 (sin dormición a cosecha), y estos perfiles fueron modificados por las condiciones de almacenamiento en seco. En este sentido, se observó al tiempo 0 post-cosecha mayores niveles de OPDA y SA en pericarpos de aquenios secos de la línea B123 con respecto a pericarpos de la línea B91. Mientras que los niveles de JA y JA-Ile fueron similares en ambas líneas. En contraposición, Preston *et al.* (2009) reportaron que en semillas secas de *Arabidopsis*, el ecotipo Col (no dormido) presentó niveles de JA, JA-Ile y SA altos a diferencia del ecotipo Cvi (dormido). Si bien el almacenamiento en seco por 33 días a 25°C±1°C modificó los niveles hormonales (JAs y SA) principalmente en la línea B123, el patrón hormonal fue similar con respecto al tiempo 0 post-cosecha. No obstante, durante el almacenamiento a -20°C±1°C, los niveles de OPDA y JA disminuyeron considerablemente en ambas líneas. En este sentido, el efecto de la baja temperatura sobre el metabolismo de JAs podría sugerir que las semillas dormidas probablemente perciben el frío como un factor de estrés. Modificaciones en el contenido de JAs por estrés por frío fue reportado por Garbero *et al.* (2010) en hojas de diferentes ecotipos de *Digitaria eriantha*.

El elevado contenido de OPDA en la línea B123 a los 0 días post-cosecha y a los 33 días de almacenamiento a -20°C±1°C, sugieren la implicancia de este compuesto en la germinación. De hecho, Dave y Graham (2012) reportaron que *cis*-OPDA interactúa con ABA inhibiendo la germinación de semillas e incrementando los niveles de la proteína ABI5. Los niveles de JA en la línea B123 fueron superiores con respecto a B91 tanto en el momento de la cosecha (0 días), como a los 33 días de almacenamiento a 25°C±1°C. No obstante, estos valores fueron inferiores en la condición de almacenamiento a -20°C±1°C. Este hecho sugiere que JA no estaría directamente involucrado con el proceso de dormición, y que su menor contenido podría estar relacionado con las condiciones de almacenamiento. Respecto a este tema, si bien es conocido que el tratamiento de semillas con JAs inhibe la germinación, todavía no está clara la relación

entre los niveles endógenos de JA y dormición y germinación (Linkies y Leubner-Metzger, 2012).

La imbibición de las semillas es un requisito previo para el control posterior tanto de los procesos de dormición como de germinación. La transición de fase II a III marca la culminación de la germinación, lo cual no se produce en semillas dormidas o muertas (Preston, *et al.*, 2009). En el presente trabajo se evaluó los niveles endógenos hormonales durante la imbibición temprana (hasta las 24 h). Los niveles de OPDA, JA y SA de pericarpo fueron modificados durante el proceso de imbibición de aquenios de ambas líneas. En *Arabidopsis thaliana*, Preston *et al.* (2009) informaron que el contenido de JA y JA-Ile cambia durante la fase I de imbibición, y varió entre los ecotipos dormidos y no dormidos. Las semillas secas del ecotipo Col (no dormido) contienen aproximadamente 10 veces más JA en comparación con las semillas del ecotipo Cvi (dormido). Este alto contenido de JA disminuyó rápidamente -aproximadamente 10 veces- a las 5 h durante la primera fase de imbibición. En consecuencia, es posible que la disminución de JA en pericarpo de las líneas B91 y B123 deba producirse a fin de que la germinación ocurra. Dave *et al.* (2011) mostraron que en el ecotipo Wassilewskija (Ws) salvaje y el mutante CTS-2 de *A. thaliana* el nivel de OPDA y JA disminuye durante la imbibición. En coincidencia con Dave *et al.* (2011) en este trabajo se detectó que el patrón general de OPDA disminuyó durante la imbibición. No obstante, en las condiciones experimentales analizadas, un pico de OPDA se observó durante la imbibición a los 0 y 33 días post-cosecha, lo que podría implicar síntesis de OPDA en pericarpo. En este sentido, sería necesario evaluar la presencia de células vivas en dicha estructura y dilucidar qué efecto fisiológico tendría este proceso.

El rol de SA en la germinación de semillas ha sido motivo de controversia, ya que hay trabajos contradictorios que sugieren que puede inhibir la germinación o aumentar el vigor de la semilla. Una reducción de SA se encontró al inicio de la imbibición en pericarpo de la línea B123. Una respuesta similar fue encontrada en semillas de *Arabidopsis* del ecotipo Cvi (dormido), donde SA decreció gradualmente seguido a la imbibición (Preston *et al.*, 2009). Debido a la cinética de acumulación de SA similar entre el momento de la cosecha y luego del almacenamiento a 25°C y -20°C se propone que esta hormona no actuaría directamente en el mantenimiento de la dormición en girasol. La eliminación de SA acumulado en el pericarpo durante la imbibición puede estar actuando sobre el crecimiento vegetativo de la plántula. Efectos estimulantes de SA sobre el crecimiento se han informado en soja (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998), trigo (Shakirova *et al.*, 2003), maíz (Gunes *et al.*, 2007) y manzanilla (Kováčik *et al.*, 2009).

En síntesis, en este trabajo ha quedado demostrado que los niveles endógenos de JAs y SA difieren cuantitativamente entre pericarpos de aquenios de las líneas B123 y B91 y que estos niveles se modifican en relación al tiempo y temperatura de almacenamiento, como así también durante el proceso de imbibición. Asimismo, de acuerdo a las condiciones experimentales analizadas se propone que OPDA estaría involucrado en el proceso de germinación.

CONCLUSIONES

- A una temperatura de almacenamiento de 25°C los aquenios dormidos fueron capaces de perder su dormición y alcanzaron porcentajes de germinación similares a aquellos no dormidos.
- El perfil hormonal del pericarpo fue diferencialmente modificado por la temperatura de almacenamiento post-cosecha y el proceso de imbibición.
- OPDA estaría involucrado en el proceso de germinación en girasol.
- La cinética de acumulación de JA evidenció que este compuesto no actuaría como mediador primario en el mantenimiento de la dormición de la línea B123.
- La dinámica de acumulación de SA demostró que esta hormona no estaría directamente involucrada en el mantenimiento de la dormición de la línea B123.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBORESI, A., C. GESTIN, M.-T. LEYDECKER, M. BEDU, C. MEYER y H.N. TRUONG. 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 28: 500-512.
- ALI-RACHEDI, S., D. BOUINOT, M.-H. WAGNER, M. BONNET, B. SOTTA, P. GRAPPIN y M. JULLIEN. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Island, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 219: 479-488.
- ALONSO-RAMÍREZ, A., D. RODRÍGUEZ, D. REYES, J.A. JIMÉNEZ, G. NICOLÁS, M. LÓPEZ-CLIMENT, A. GÓMEZ-CADENAS y C. NICOLÁS. 2009. Crosstalk between gibberellins and salicylic acid in early stress responses in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Signal. Behav.* 4: 750-751.
- AN, C. y Z. MOU. 2011. Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 53: 412-428.
- BAEK, D., P. PATHANGE, J.-S. CHUNG, J. JIANG, L. GAO, A. OIKAWA, M. YOKOTA HIRAI, K. SAITO, P.W. PARE y H. SHI. 2010. A stress-inducible sulphotransferase sulphonates salicylic acid and confers pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 33: 1383-1392.
- 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.
- BATLLA, D. y R.L. BENECH-ARNOLD. 2005. Changes in the light sensitivity of buried *Polygonum aviculare* seeds in relation to cold-induced dormancy loss: development of a predictive model. *New Phytol.* 165: 445-452.
- BAZIN, J., D. BATLLA, S. DUSSERT, H. EL-MAAROUF-BOUTEAU y C. BAILLY. 2011. Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower sedes during dry after-ripening. *J. Exp. Bot.* 62: 627-640.
- BÖTTCHER, C., y S. POLLMANN. 2009. Plant oxylipins: plant responses to 12-oxo-phytodienoic acid governed by its specific structural and functional properties. *FEBS J.* 276: 4693-470.
- BRADFORD, K.J y H. NONOGAKI. 2007. *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing Plant Science, Oxford. 388 p.
- BROWN, J.H., J.F. GILLOOLY, A.P. ALLEN, V.M. SAVAGE y G.B. WEST. 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85: 1771-1789.

- CADMAN, C.S.C., P.E. TOOROP, H.W.M. HILHORST y W.E. FINCH-SAVAGE. 2006. Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J.* 46: 805-822.
- CATINOT, J., A. BUCHALA, E. ABOU-MANSOUR y J.P. METRAUX. 2008. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett.* 582: 473-478.
- CHACÓN, P. y R.O. BUSTAMANTE. 2001. Effect of seed size and pericarp on seedling recruitment and biomass in *Cryptocarya alba* (Lauraceae) under two contrasting moisture regimes. *Plant Ecol.* 152: 137-144
- CHEN, Z., Z. ZHENG, J. HUANG, Z. LAI y B. FAN B. 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav.* 4: 493-496.
- CLARKE, S.M., L.A.J. MUR, J.E. WOOD y I.M. SCOTT. 2004. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38: 432-437.
- 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.
- DAVE, A y I.A. GRAHAM. 2012. Oxylipin signaling: a distinct role for the jasmonic acid precursor cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (cis-OPDA). *Plant Sci.* 3: 1-6.
- DEAN, J.V. y S.P. DELANEY. 2008. Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 132: 417-25.
- DELANEY, T.P. 2004. Salicylic acid. En: Ed. Davies, P.J. *Plant Hormones*, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. p. 635-653.
- DEMPSEY, D. A., A. C. VLOT, M.C. WILDERMUTH y D.F. KLESSIGA. 2011. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book* 9: e0156.
- DERKS, M.P.M. y C.M. KARSSSEN. 1993. Changing sensitivity to light and nitrate but not to gibberellins regulates seasonal dormancy patterns in *Sisymbrium officinale* seeds. *Plant Cell Environ.* 16: 469-479.
- DUKE, J.A. 1983. Handbook of energy crops. En: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/dukeindex.html. Consultado: 07-03-2013.
- 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.

- DURNER, J., J. SHAH y D.F. KLESSIG. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 266-274.
- EL-BASYOUNI, S.Z., D. CHEN, R.K. IBRAHIM, A.C. NEISH y G.H.N. TOWERS. 1964. The biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Phytochem.* 3: 485-492.
- ESCANDE, A. 2009. Documento Base del Programa Nacional: Oleaginosas. INTA. 25 p.
- 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. *Annu. Plant Rev.* 27: 176-223.
- FICK, G.N. 1978. Breeding and genetics. En: Ed. Carter, J. Sunflower Science and Technology. American Society of Agronomy, Madison, USA. p. 279-338.
- FINCH-SAVAGE, W.E. y G. LEUBNER-METZGER. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.
- FINFELSTEIN, R., W. REEVES, T. ARIIZUMI y C. STEBER. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 387-415.
- GARBERO, M., H. PEDRANZANI, F. ZIRULNIK, A. MOLINA, M. V. PÉREZ-CHACA, A. VIGLIOCCO y G. ABDALA. 2010. Short-term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: effects on stress-related hormones and antioxidant defense system. *Acta Pyisiol. Plant* 33: 497-507.
- GARCION, C., A. LOHMANN, E. LAMODIÉRE, J. CATINOT, A. BUCHALA, P. DOERMANN y J.P. MÉTRAUX. 2008. Characterization and biological function of the Isochorismate Synthase 2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147: 1279-1287.
- GIDDA, K.S., O. MIERSCH, J. SCHMIDT, C. WASTERACK y L. VARIN. 2003. Biochemical and molecular characterization of a hydroxy-jasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 17895-17900.
- GOGGIN, D.E., K.J. STEADMAN, R.J. EMERY, S.C. FARROW, R. BENECH-ARNOLD y S.B. POWLES. 2009. ABA inhibits germination but not dormancy release in mature imbibes seeds of *Lolium rigidum* Gaud. *J. Exp. Bot.* 12: 3387-3396.
- GUAN, L. y J.G. SCANDALIOS. 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5930-5934.
- GUNES, A., A. INAL, M. ALPASLAN, F. ERASLAN, E. GUNERI BAGCI y N. CICEK. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J. Plant Physiol.* 164: 728-736.

- GUTIÉRREZ-CORONADO, M.A., C. TREJO-LÓPEZ y A. LARQUÉ-SAAVEDRA. 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 563-565.
- HOLDSWORTH, M.J., L. BENTSINK y W.J.J. SOPPE. 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, afterripening, dormancy and germination. *New Phytol.* 179: 33-54.
- HOLDSWORTH, M.J., W.E. FINCH-SAVAGE, P. GRAPPIN y D. JOB. 2008. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends Plant Sci.* 13(1): 7-13.
- HOWE, G.A. 2005. Jasmonates as signals in the wound response. *J. Plant Growth Reg.* 23: 223-237.
- ISHIGURO, S., A. KAWAI-ODA, J. UEDA, I. NISHIDA y K. OKADA. 2001. The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2191-2209.
- KELLY, K.M., J. VAN STADEN y W.E. BELL. 1992. Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Regul.* 11: 201-209.
- KOCH, T., K. BANDEMER y W. BOLAND. 1997. Biosynthesis of cis-jasmone: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helv. Chim. Acta.* 80: 838-850.
- KOO, A.J.K., X. 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: 974-986.
- KOVÁČIK, J., J. GRÚZ, M. BACKOR, M. STRNAD y M. REPCÁK. 2009. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Rep.* 28: 135-143.
- 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: 177-188.
- LEE, J.S. 1998. The mechanism of stomatal closing by salicylic acid in *Commelina communis* L. *J Plant Biol.* 41: 97-102.
- LEE, S. y C-M. PARK. 2010. Modulation of reactive oxygen species by salicylic acid in *Arabidopsis* seed germination under high salinity. *Plant Signal. Behav.* 12: 1534-1536.
- 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.

- LEYMARIE, J., M.E. ROBAYO-ROMERO, E. GENDREAU, R.L. BENECH-ARNOLD y F. CORBINEAU. 2008. Involvement of ABA in induction of secondary dormancy in barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. *Plant Cell Physiol.* 49: 1830-1838.
- LINDSTRÖM, L. I., C.N. PELLEGRINI y L.F. HERNÁNDEZ. 2000. Anatomía y desarrollo del pericarpo de distintos genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L.). En: Proc. **15th International Sunflower Conference**. Toulouse, Francia. p: 13-18.
- LINKIES, A. y G. LEUBNER-METZGER. 2012. Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Rep.* 31: 253-270.
- LIU, P.-P., C.C. VON DAHL, S.-W. PARK y D.F. KLESSIG. 2011. Interconnection between methyl salicylate and lipid-based long-distance signaling during the development of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Physiol.* 155: 1762-1768.
- MAGYP, 2011. En: <http://www.minagri.gob.ar/site/index.php>. Consultado: 07-03-2013.
- 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.
- MANTESE, A.I., D. MEDAN y A.J. HALL. 2006. Achene structure, development and lipid accumulation in sunflower cultivars differing in oil content at maturity. *Ann. Botany* 97: 999-1010.
- MANUGISTICS. 1997. Statgraphics plus for Windows 3.0. Manugistics, Rockville, Maryland, USA.
- MARUTA, E., T. KAMITANI, M. OKABE y Y. IDE. 1997. Desiccation-tolerance of *Fagus crenata* Blume seeds from localities of different snowfall regimes in central Japan. *J. For. Res.* 2: 45-50.
- MCCUE, P., Z. ZHENG, J.L. PINKHAM y K. SHETTY. 2000. A model for enhanced pea seedling vigor following low pH and salicylic acid treatments. *Process Biochem.* 35: 603-613.
- MÉTRAUX, J.P., H. SIGNER, J.A. RYALS, E. WARD, M. WYSS-BENZ, G.K. RASCHDORF, E. SCHMID, W. BLUM y B. INVERARDI. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science.* 250: 1004-1006.
- MIERSCH, M., J. NEUMERKEL, M. DIPPE, I. STENZEL y C. WASTERACK. 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.
- MILLAR, A.A., J.V. JACOBSEN, J.J. ROSS, C.A HELLIWELL, A.T. POOLE, G. SCOFIELD, J.B. REID y F. GUBLER. 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hidroxylase. *Plant J.* 45: 942-954.

- MINAGRI 2013. Sistema integrado de información Agropecuaria. En: <http://www.siiia.gov.ar/series>. Consultado: 12-06-2013.
- MORRIS, K., S.A.H. MACKERNESS, T. PAGE, C.F. JOHN, A.M. MURPHY, J.P. CARR y V. BUCHANAN-WOLLASTON. 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* 23: 677-685.
- NORMAN, C., K.A. HOWELL, A.H. MILLAR, J.M. WHELAN y D.A. DAY. 2004. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* 134: 492-501.
- OGAWA, K. y M. IWABUCHI. 2001. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 42(3): 286-291.
- 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.
- OHKAMA-OHTSU, N., Y. SASAKI-SEKIMOTO, A. OIKAWA, Y. JIKUMARU, S. SHINODA, E. INOUE, Y. KAMIDE, T. YOKOYAMA, M. YOKOTA HIRAI, K. SHIRASU, Y. KAMIYA, D.J. OLIVER y K. SAITO. 2010. 12-Oxo-Phytodienoic Acid–Glutathione conjugate is transported into the vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 52: 205-209.
- ORACZ, K., H. EL-MAAROUF-BOUATEAU, 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.
- ORACZ, K., H. EL-MAAROUF-BOUATEAU, R. BOGATEK, F. CORBINEAU y C. BAILLY. 2008. Release of sunflower seed dormancy by cyanide: cross-talk with ethylene signalling pathway. *J Exp Bot.* 59: 2241-2251.
- PASCALE, N.C. y E. DE LA FUENTE. 1992. Generalidades- Producción de Girasol, Cuaderno de Actualización Técnica N° 40, Tercera Edición Actualizada. CREA. 1: 7-8.
- PIETERSE, C.M., A. LEON-REYES, S. VAN DER ENT y S.C.M. VAN WEES. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chem. Biol.* 5: 308-316.
- POZO, M.J., L.C.VAN LOON y C.M.J. PIETERSE. 2005. Jasmonates-signals in plant- microbe interactions. *J. Plant Growth Regul.* 23: 211-222.
- 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.

- PROBERT, R.J. 2000. The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. En: Ed. Fenner M. *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*. CABI Publishing, Oxon, Inglaterra. p: 261-292.
- RAES, J., A. ROHDE, J.H. CHRISTENSEN, Y. VAN DE PEER y W. BOERJAN. 2003. Genome-wide characterisation of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 1051-1071.
- RAJOU, L., M. BELGHAZI, R. HUGUET, C. ROBIN, A. MOREAU, C. JOB y D. JOB. 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol.* 141: 910-923.
- RASKIN, I., A. EHMANN, W.R. MELANDER y B.J.D. MEEUSE. 1987. Salicylic acid: A natural inducer of heat production in *Arum lilies*. *Science.* 237: 1601-1602.
- RATE, D.N., J.V. CUENCA, G.B. BOWMAN, D.S. GUTTMAN y J.T. GREENBERG. 1999. The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defense, and cell growth. *Plant Cell* 11: 1695-1708.
- REGINATO, M.A., G.I. ABDALA, O. MIERSCH, O.A. RUIZ, E. MOSCHETTI y V. LUNA. 2012. Changes in the levels of jasmonates and free polyamines induced by Na₂SO₄ and NaCl in roots and leaves of the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Biología* 67: 689-697.
- REYMOND, P., H. WEBER, M. DIAMOND y E.E. FARMER. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-719.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A., L. NAVARRO, R. BARI y J.D.G. JONES. 2007. Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 372-379.
- ROHDE, A., K. MORREEL, J. RALPH, G. GOEMINNE, V. HOSTYN, R. DE RYCKE, S. KUSHNIR, J. VAN DOORSSELAERE, J.P. JOSELEAU, M. VUYLSTEKE, G. VAN DRIESSCHE, J. VAN BEEUMEN, E. MESSENS y W. BOERJAN. 2004. Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell* 16: 2749-2771.
- ROJO HERNÁNDEZ, C. 2005. *Acondicionamiento osmótico de simientes de girasol (Helianthus annuus L.) para el avance de la germinación en siembras precoces para zonas áridas*. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España. 278 p.

RONDANINI, D., R. SAVIN y A.J. HALL. 2003. Dynamics of fruit growth and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to brief intervals of high temperature during achene filling. *Field Crops Res.* 83: 79-90.

SAWADA, H., I.S. SHIM y K. USUI. 2006. Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis-modulation by salt stress in rice seedlings. *Plant Sci.* 171: 263-270.

SCHALLER, F., A. SCHALLER y A. STINTZI. 2005. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* 23: 179-199.

SEMBDNER, G. y B. PARTHIER. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 569-589.

SEO, H.S., J.T. SONG, J.J. CHEONG, Y.H. LEE, Y.W. LEE, I. HWANG, J.S. LEE y Y.D. CHOI. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 4788-4793.

SERINO, L., C. REIMMANN, H. BAUR, M. BEYELER, P. VISCA y D. HAAS. 1995. Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Genet. Genomics.* 249: 217-228.

SHAH, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 365-371.

SHAKIROVA, F.M., A.R. SAKHABUTDINOVA, M.V. BEZRUKOVA, R.A. FATKHUTDINOVA y D.R. FATKHUTDINOVA. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164: 317-322.

SILVERMAN, P., M. SESKAR, D. KANTER, P. SCHWEIZER, J.P. METRAUX y I. RASKIN. 1995. Salicylic acid in rice: biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant Physiol.* 108: 633-639.

SONG, J.T., Y.J. KOO, H.S. SEO, M.C. KIM y Y.D. CHOI. 2008. Overexpression of AtSGT1, an *Arabidopsis* salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry.* 69(5): 1128-34.

STACEY, G., C.B. MCALVIN, S.Y. KIM, J. OLIVARES y M.J. SOTO. 2006. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicas* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141: 1473-1481.

STASWICK, P.E., y I. TIRYAKI. 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2117-2127.

STELMACH, B.A., A. MULLER, P. HENNIG, S. GEBHARDT, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ y E.W. WEILER. 2001. A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyldiglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276: 12832-12838.

- STEVENS, M. 2000. Annual sunflower: *Helianthus annuus* L. USDA/NRCS Plant Guide. USDA, NRCS, National Plant Data Center. En: http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs_hean3.pdf. Consultado: 07-03-2013.
- STICHER, L., B. MAUCH-MANI y J.P. MÉTRAUX. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.
- STINTZI, A. y J. BROWSE. 2000. The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 10625-10630.
- 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 Res.* 30: 325-327.
- SWIATEK, A., W. VAN DONGEN, E.L. ESMANS y H. VAN ONCKELEN. 2004. Metabolic fate of jasmonates in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 135: 161-172.
- TRAW, M.B. y J. BERGELSON. 2003. Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 1367-1375.
- UPPALAPATI, S.R., Y. ISHIGA, T. WANGDI, B.N. KUNKEL, A. ANAND, K.S. MYSORE y C.L. BENDER. 2007. The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 955-965.
- VAN DER GRAAFF, E., R. SCHWACKE, A. SCHNEIDER, M. DEESIMONE, U.-I. FLÜGGE y R. KUNZE. 2006. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* 141: 776-792.
- VLOT, A.C., D.A. DEMPSEY y D.F. KLESSIG. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 47: 177-206.
- WASTERNAK, C. y B. PARTHIER. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2: 302-307.
- WASTERNAK, C. y B. HAUSE. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 165-221.
- WASTERNAK, C. 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Botany.* 100: 681-697.
- 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.
- WILDERMUTH, M.C., J. DEWDNEY, G. WU y F.M. AUSUBEL. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. *Nature.* 414: 562-565.

- XIAO, W.H., R.W. YAN y P.W. YAN. 2009. Effects of the pericarp on imbibition, seed germination, and seedling establishment in seeds of *Hedysarum scoparium* Fisch. et Mey. *Ecol. Res.* 24: 559-564.
- XIE, Z., Z.-L. ZHANG, S. HANZLIK, E. COOK y Q.J. SHEN. 2007. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. *Plant Mol. Biol.* 64: 293-303.
- YAMAGUCHI, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225-51.
- YANO, R., Y. KANNO, Y. JIKUMARU, K. NAKABAYASHI, Y. KAMIYA y E. NAMBARA. 2009. CHOTTO1, a putative double APETALA2 repeat transcription factor, is involved in abscisic acid-mediated repression of gibberellin biosynthesis during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151: 641-654.
- ZHANG, Z., Q. LI, Z. LI, P.E. STASWICK, M. WANG, Y. ZHU y Z. HE. 2007. Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiol.* 145:450-64