

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

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

**ÁCIDO ABSCÍSICO Y GIBERELINAS: SU
PARTICIPACIÓN EN LA DORMICIÓN Y
GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE GIRASOL (*Helianthus
annuus L.*)**

**Alumna: Clarisa Noemí Palacio
DNI: 30.990.305**

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

**Río Cuarto, Córdoba, Argentina
Diciembre 2014**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Ácido abscísico y giberelinas: su participación en la dormición y germinación de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.).

Autora: Palacio, Clarisa Noemí

DNI: 30.990.305

Directora: Vigliocco, Ana

Co-Directora: Andrade, Andrea

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Fecha de Presentación: ____/____/____.

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

Secretario Académico

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	V
SUMMARY	VI
INTRODUCCIÓN	1
- Origen del cultivo de girasol, distribución e importancia en la producción agropecuaria.....	1
- Descripción botánica del girasol.....	2
- Germinación y dormición de las semillas.....	3
- Ácido abscísico: generalidades, biosíntesis y funciones fisiológicas.....	5
- Giberelinas: generalidades, biosíntesis y funciones fisiológicas.....	7
- Rol de ABA y GAs en la germinación y dormición de semillas.....	9
- Hipótesis.....	10
- Objetivo general.....	10
- Objetivos específicos.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
- Material vegetal.....	11
- Material vegetal y Condiciones de almacenamiento.....	11
- Obtención de embrión para las determinaciones hormonales.....	11
- Extracción y cuantificación de hormonas.....	11
- Análisis estadístico.....	12
RESULTADOS	13
- Niveles hormonales endógenos en embrión de semillas secas.....	13
- Niveles hormonales endógenos en embrión de semillas embebidas.....	14
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA CITADA	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
Fig. 1. Distribución del cultivo de girasol en Argentina.....	1
Fig. 2. Sección longitudinal del capítulo de <i>Helianthus annuus</i>	2
Fig. 3. Cipsela de girasol: semilla, cubierta seminal y pericarpo.....	3
Fig. 4. Estructura química del ácido abscísico.....	5
Fig. 5. Biosíntesis de ABA y sus catabolitos.....	6
Fig. 6. Estructura química de GA ₁	7
Fig. 7. Biosíntesis de GAs	8
RESULTADOS	13
Fig. 8. Niveles endógenos de ABA, GA ₁ y GA ₃ (pmol.g ⁻¹ PS) en embrión de semillas secas de girasol de las líneas B123 y B91 a 0 días post-cosecha (n=4 ± SE).....	13
Fig. 9. Niveles endógenos de ABA, GA ₁ y GA ₃ (pmol.g ⁻¹ PS) en embrión de semillas secas de girasol de las líneas B123 y B91, almacenados por 33 días post-cosecha a 25°C±1°C (n=4 ± SE). 13	13
Fig. 10. Niveles endógenos de ABA (pmol.g ⁻¹ PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a 0 días post-cosecha (n=4 ± SE).....	14
Fig. 11. Niveles endógenos de ABA (pmol.g ⁻¹ PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición, almacenados por 33 días post-cosecha a 25°C±1°C (n=4 ± SE). 15	15
Fig. 12. Niveles endógenos de GA ₁ (pmol.g ⁻¹ PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha (n=4 ± SE).....	15
Fig. 13. Niveles endógenos de GA ₁ (pmol.g ⁻¹ PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición, almacenados por 33 días post-cosecha a 25°C±1°C (n=4 ± SE).....	16
Fig. 14. Niveles endógenos de GA ₃ (pmol.g ⁻¹ PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha (n=4 ± SE).....	17
Fig. 15. Niveles endógenos de GA ₃ (pmol.g ⁻¹ PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición, almacenados por 33 días post-cosecha a 25°C±1°C (n=4 ± SE).....	17

RESUMEN

Ácido abscísico (ABA) y Giberelinas (GAs) son los principales reguladores del crecimiento involucrados en la dormición y germinación de semillas. El objetivo del presente trabajo fue analizar los niveles endógenos de ABA, GA₁ y GA₃ en embriones de semillas secas y embebidas de *Helianthus annuus* L. de dos líneas endocriadas: B123 (con dormición a cosecha) y B91 (sin dormición a cosecha) al momento de cosecha (0 días) y luego del almacenaje por 33 días a 25°C±1°C. Las hormonas se identificaron y cuantificaron por Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas Tándem (LC/MS-MS). Los resultados mostraron que los niveles endógenos de las fitohormonas varían durante la imbibición y según el tiempo y temperatura de almacenamiento post-cosecha. A 0 días, los altos niveles de ABA en embriones de semillas secas B123 serían responsables de la imposición de la dormición. A los 33 días post-cosecha, ABA disminuyó en embriones de B123 y GA₃ aumentó, hecho que se relacionó con la pérdida de dormición en esta línea. Las diferencias en el balance hormonal ABA:GAs durante la imbibición temprana explicarían las discrepancias observadas en el porcentaje de germinación entre ambas líneas. Así, el incremento de ABA registrado durante la imbibición de semillas B123 a 0 días post-cosecha corroboraría su implicancia en el mantenimiento de la dormición de estas semillas. Por el contrario, durante la imbibición de la línea B91 se observó un descenso de ABA y un incremento significativo de GA₁ y GA₃ a las 12 h de imbibición respecto a B123. La importancia relativa de GA₃ y GA₁ se evidenció durante la imbibición temprana de semillas B91 almacenadas durante 33 días. GA₃ estaría involucrada en procesos iniciales de la imbibición (3 y 6 h), mientras que GA₁ se relacionaría con procesos tardíos (12, 18 y 24 h).

Palabras claves: Ácido abscísico, dormición, embrión, giberelinas, girasol.

SUMMARY

Abscisic acid (ABA) and gibberellins (GAs) are important regulators of growth involved in dormancy and germination of seeds. The objective of this study was to analyze the endogenous levels of ABA, GA₁ and GA₃ in embryos of dry and imbibed seeds of *Helianthus annuus* L. two inbred lines: B123 (with dormancy to harvest) and B91 (no dormancy at harvest) at harvest (0 days) and after storage for 33 days at 25 ± 1 ° C. The phytohormones were identified and quantified by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC / MS-MS). The results showed that the levels of endogenous phytohormones during imbibition vary according to the time and temperature of post-harvest storage. At 0 days, the high level of ABA in embryo of dry seeds B123 would be responsible for the imposition of dormancy. At 33 days after harvest, ABA decreased and GA₃ increased in B123 embryos, a fact that was associated with the loss of dormancy in this line. Differences in hormonal balance ABA: GAs during early imbibition explain discrepancies in germination percentage between the two lines. Thus, the increase in ABA during imbibition of B123 seed at 0 days corroborate its implication in maintaining dormancy of these seeds. By contrast, during the B91 imbibition, ABA decreased and a significant increase of GA₁ and GA₃ was observed at 12 h of imbibition. The relative importance of GA₃ and GA₁ was evident during early seed imbibition of B91 stored for 33 days. GA₃ would be involved in initial imbibition processes (3 and 6 h), while GA₁ would relate to later processes (12, 18 and 24 h).

Keywords: abscisic acid, dormancy, embryo, gibberellins, sunflower.

INTRODUCCIÓN

Origen del cultivo de girasol, distribución e importancia en la producción agropecuaria

El girasol (*Helianthus annuus* L.), es un cultivo oleaginoso de gran importancia en la producción agropecuaria. La situación actual del mercado mundial de granos oleaginosos, de aceites y las tecnologías aplicadas al cultivo, son factores que aumentan la importancia del mismo (Bigler, 2014).

El girasol procede del oeste de América del Norte; no obstante, se cultiva en todo el mundo, ya que actualmente se dispone de un importante número de híbridos que se adaptan a diversas condiciones agroecológicas. Argentina es uno de los primeros exportadores mundiales de su aceite. En las últimas cinco campañas (2009/13) la superficie implantada con girasol fue de 1.740.968 ha, mientras que en la última (2012/13) fue de 1.650.000 ha y el rinde promedio de 1.878 kg/ha (MINAGRI, 2013). El área potencialmente cultivable de girasol se extiende desde Chaco en el norte, hasta el sur de la región pampeana (Díaz Zorita, 2003). Las zonas de producción son: norte de Santa Fe y Chaco (17% de la producción), 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) (Fig. 1).

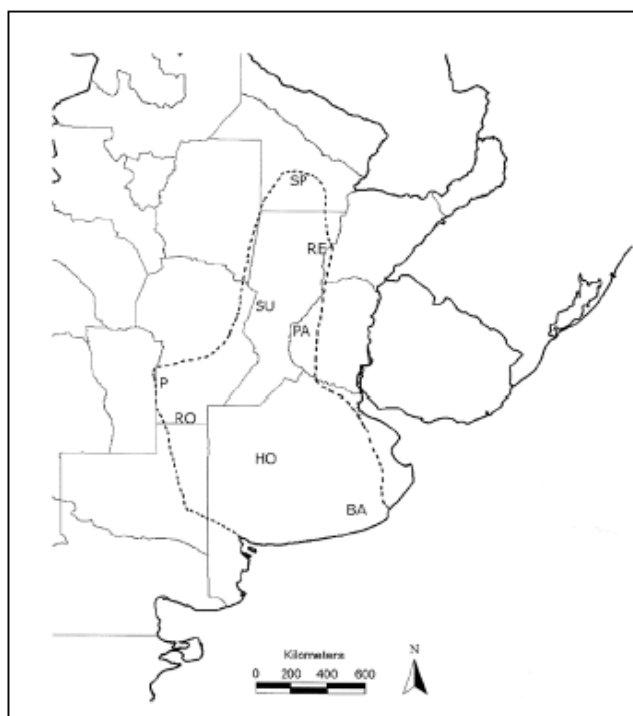


Figura 1. Distribución del cultivo de girasol en Argentina (Torretta et al., 2010).

Este cultivo se utiliza principalmente en la industria aceitera, obteniéndose harinas como subproductos luego del procesamiento de los granos. La harina se utiliza en la industria de alimentos ya que contiene entre 40 y 50% de proteínas, siendo por lo tanto atractiva para la alimentación del ganado. El aceite es beneficioso para la salud humana por su alto contenido de grasas poliinsaturadas y se utiliza puro o en mezclas, para consumo directo y para fabricar margarinas (Pascale y De la Fuente, 1987). En menor medida se utiliza como ornamental, confitero y para la alimentación de aves (Satorre, 2004).

Descripción botánica del girasol

El girasol, perteneciente a la familia *Asteraceae* y al género *Helianthus*, comprende numerosas especies, siendo *annuus* la más utilizada como cultivo extensivo. Es una planta herbácea, de tipo C3, con crecimiento anual y alto porte, pudiendo alcanzar los 2 m (dependiendo de la zona y las condiciones agroecológicas); presenta un tallo erecto, vigoroso, cilíndrico y macizo. La raíz es pivotante, está compuesta de una raíz primaria y raíces secundarias, lo que le permite explorar grandes profundidades del suelo. Las hojas son de gran tamaño, su número varía según el cultivar, disponiéndose en el tallo de manera alterna. La inflorescencia denominada capítulo presenta dos tipos de flores que se insertan en el receptáculo. En la periferia se encuentran las flores liguladas, las cuales son estériles con su corola semejante a un pétalo de color amarillo. Por dentro de éstas se encuentran las flores tubuladas, las cuales son fértiles y se disponen de forma acrópeta sobre el receptáculo, siendo las mismas de color marrón café. Rodeando la circunferencia del capítulo se observan brácteas protectoras que recubren a las flores anteriormente descritas (Fig. 2).

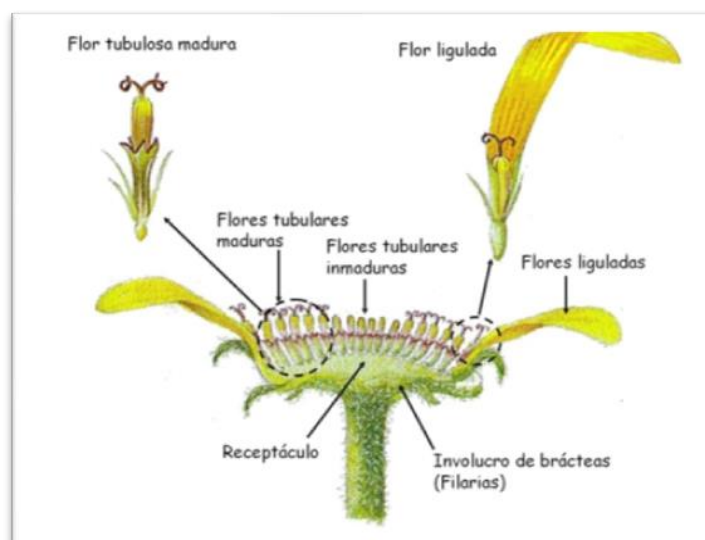


Figura 2. Sección longitudinal del capítulo de *Helianthus annuus* (Universidad Politécnica de Valencia, 2014a)

La semilla de girasol es un fruto seco indehiscente de tipo cipsela, de forma romboidal. Según el cultivar, su longitud varía entre 8 a 20 mm, con un ancho de 4 a 14 mm y un espesor de 2 a 5 mm. La cipsela está conformada por: I) el *pericarpo*, de consistencia fibrosa y dura, aterciopelado al tacto y de color variable según el cultivar, el cual representa el 20-25% del peso seco del grano, II) la *cubierta seminal*, que mantiene al pericarpo unido al embrión y III) el *embrión*, formado por el eje embrionario ubicado en el ápice, y dos cotiledones grandes de consistencia carnosa (Satorre, 2004; Rojo Hernández, 2005) (Fig. 3).



Figura 3. Cipsela de girasol: semilla, cubierta seminal y pericarpo.

(Universidad Politécnica de Valencia, 2014b)

Germinación y dormición de las semillas

Una semilla tiene la capacidad de germinar bajo una gran diversidad de factores ambientales (Baskin y Baskin, 2004). Para lograr el establecimiento de una especie en un ecosistema debe producirse una combinación óptima de procesos internos, propios de la semilla, y factores externos o ambientales que le permitan germinar. Sin embargo, las semillas pueden no germinar bajo condiciones ambientales favorables. En este sentido, el conjunto de sucesos que conducen a que una semilla madura viable no puedan completar su proceso germinativo bajo condiciones ambientales favorables se define como **dormición** (Koornneef *et al.*, 2002). Este estado no sólo está asociado con la ausencia de germinación, sino que son características intrínsecas de la semilla que inhiben el proceso de germinación (Linkies y Leubner-Metzger, 2012).

La dormición está determinada por propiedades morfológicas y fisiológicas de las semillas. En base a esto, Baskin y Baskin (2004) propusieron una clasificación que incluye cinco clases de dormición en semillas: fisiológica (*DF*), morfológica (*DM*), morfo-fisiológica (*DMF*), física (*DF*) y combinada (*DFI + DFS*).

Dormición fisiológica (DFI): determinada por mecanismos fisiológicos que ocurren en el embrión y cubiertas seminales, como pericarpo y testa, los cuales impiden la emergencia de la radícula.

Dormición morfológica (DM): evidente en semillas con embriones no desarrollados (en cuanto a su tamaño) pero sí diferenciados, por ejemplo en cotiledones y eje hipocótilo-radícula. Estos embriones sólo necesitan tiempo para crecer y luego germinan.

Dormición física (DFS): causada por la impermeabilidad de las cubiertas duras tanto de semillas o frutos, las cuales impiden el ingreso de agua a la semilla.

Dormición morfo-fisiológica (DMF): presente en semillas con embriones no desarrollados que poseen un componente fisiológico adicional en su dormición.

Dormición combinada (DFI + DFS): evidente en semillas con cubiertas impermeables al agua combinado con dormición fisiológica del embrión.

Por otra parte, la liberación de la dormición es un proceso regulado a través de una interacción compleja entre factores ambientales y genéticos. Asimismo, el estado de dormición de una semilla puede ser eliminado por diferentes tratamientos tales como: escarificación, almacenamiento prolongado en condiciones secas, estratificación, aplicación de compuestos nitrogenados (óxido nítrico, nitrato) entre otros métodos (Finkelstein *et al.*, 2008; Weitbrecht, 2011; Linkies y Leubner-Metzger, 2012).

En girasol existe una alta variabilidad en la dormición de las semillas entre los genotipos existentes e inclusive dentro de un mismo genotipo dependiendo del origen y de las condiciones agro-ecológicas (Subrahmanyam *et al.*, 2002). Este hecho puede causar problemas debido al escalonamiento que se produce en la germinación, inconveniente ocasionado por falta de uniformidad espacial, aunque especialmente temporal, en la geminación de semillas.

En cuanto a estructura seminal, la dormición puede estar controlada tanto por el embrión, el pericarpo y/o la cubierta seminal, pudiendo extenderse entre 40 y 50 días post-cosecha (Rojo Hernández, 2005; Maiti *et al.*, 2006).

El control de la germinación y dormición de las semillas es un proceso muy complejo donde participan diversas fitohormonas (Kucera *et al.*, 2005; Linkies y Leubner-Metzger, 2012). El ácido abscísico (ABA) conjuntamente con las giberelinas (GAs) juegan un rol central en la modulación de la germinación y/o dormición. Sin embargo, es bien conocido que ellas requieren de la interacción con otras fitohormonas tales como auxinas, citocininas, etileno, jasmonatos, ácido salicílico y brasinoesteroides (Jung y Park, 2011; Linkies y Leubner-Metzger, 2012; Arc *et al.*, 2013; Miransari y Smith, 2014).

Considerando la importancia económica del cultivo de girasol en Argentina, y en vista de que se han detectado problemas de dormición en semillas provenientes de contraestación, lo cual afectaría el establecimiento de plántulas a campo (comunicación personal, Dr.

Alemano S.), es importante examinar el rol del embrión de semillas de girasol en el proceso de dormición y cómo los niveles hormonales endógenos de ABA y GAs están involucrados en el mantenimiento de la misma, su ruptura y germinación.

Ácido abscísico: generalidades, biosíntesis y funciones fisiológicas

ABA es un compuesto esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, encontrándose también en musgos, algas verdes, cianobacterias y varios hongos fitopatógenos. Químicamente es un sesquiterpeno, sintetizado en cloroplastos y otros plastidios, y se acumula en compartimentos celulares alcalinos, dependiendo de los valores relativos de pH intra y extracelulares (Fig. 4).

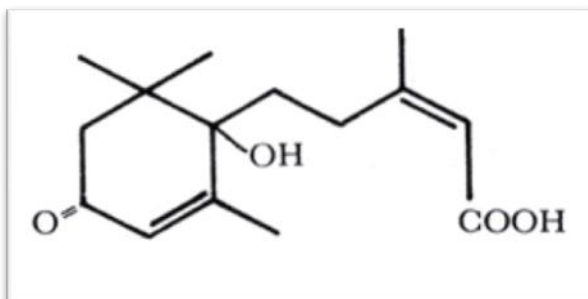


Figura 4. Estructura química del ácido abscísico. (Ascón-Bieto y Talón 2000)

En plantas superiores la biosíntesis de ABA se inicia con el isopentenil pirofosfato (IPP), precursor de todos los terpenoides, así como también de muchas hormonas vegetales. Los primeros pasos biosintéticos ocurren en cloroplastos u otros plastidios, en tanto que la síntesis de la hormona biológicamente activa tiene lugar en citosol. La biosíntesis específica de ABA comienza a partir de la epoxidación de zeaxantina y anteraxantina a violaxantina, reacción catalizada por la acción de la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) (Agrawal *et al.*, 2001). Posteriormente violaxantina es convertida a los isómeros cis-violaxantina y cis-neoxantina, siendo esta reacción catalizada por la enzima ABA4 (Nort *et al.*, 2007). Seguidamente ambos compuestos son sustratos para la enzima 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa (NCED); produciéndose una escisión oxidativa de cis-violaxantina y cis-neoxantina conduciendo a la formación de xantoxina, primer precursor citoplásmico para la síntesis de ABA (Schwartz *et al.*, 2003). En citoplasma, una reacción de dos etapas vía ABA-aldehído convierten xantoxina a ABA. En el primer paso, xantoxina se convierte a ABA-aldehído por una reacción catalizada por la enzima ABA2, perteneciente a la familia de deshidrogenasas de cadena corta (DEG) (Cheng *et al.*, 2002). Finalmente, la enzima

ABA-aldehído oxidasa (AAO) cataliza la transformación de ABA-aldehído a ABA activo (Seo *et al.*, 2004).

Por otro parte ABA puede ser catabolizado, por oxidación o conjugación. En la vía oxidativa, ABA puede ser hidroxilado en tres grupos metilo diferentes de su estructura química (C-7', C-8' y C-9'). Entre los productos hidroxilados, 8'-hidroxi-ABA puede espontáneamente originar ácido faseico (PA), el cual subsecuentemente se reduce a ácido dihidrofaseico (DPA) (Nambara y Marion-Poll, 2005). Respecto a la inactivación por conjugación, ABA puede conjugarse con glucosa formando glucosil ésteres (ABA-GE) por acción de la enzima ABA glucosiltransferasa (Xu *et al.*, 2002). Es de destacar que el catabolismo de ABA (oxidación y/o conjugación) juega un importante rol en la regulación de sus niveles endógenos frente a diferentes condiciones fisiológicas y ambientales (Ye *et al.*, 2012) (Fig. 5).

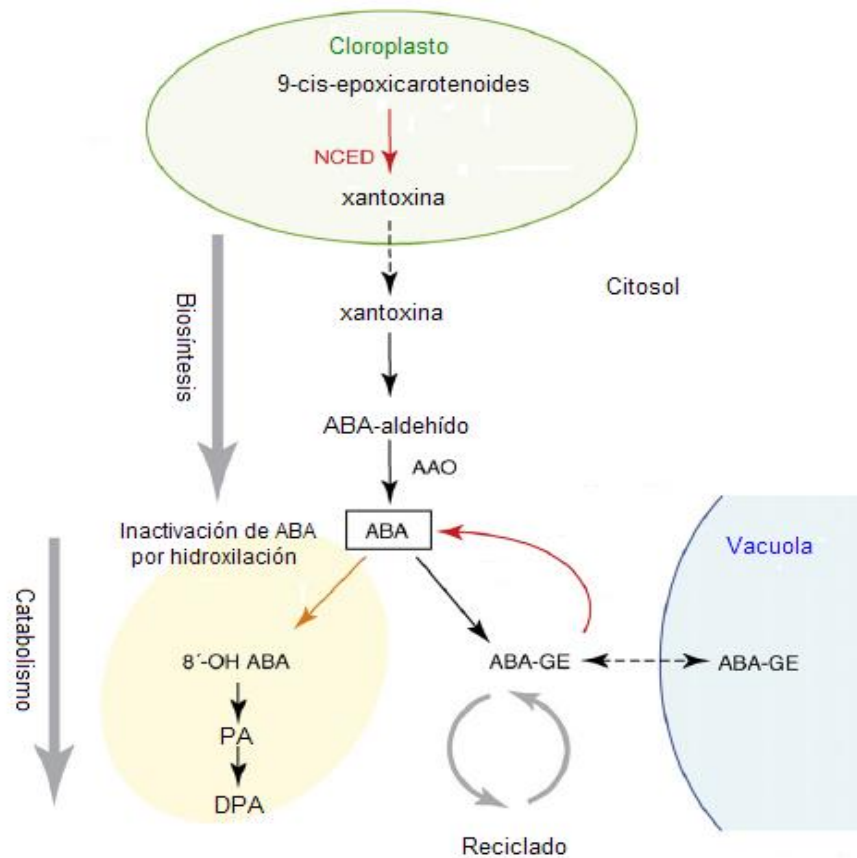


Figura 5. Biosíntesis de ABA y sus catabolitos (Adaptado de Seki *et al.*, 2007).

ABA es una fitohormona involucrada en las respuestas a factores de estrés, biótico y abiótico; entre ellos, hídrico, salino, térmico y el ocasionado por patógenos (Ton *et al.*, 2009; de Ollas *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Además se ha demostrado que regula muchos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, entre los que se pueden mencionar: maduración de la semilla, síntesis de proteínas y lípidos de reserva (Seo y Koshiba, 2002;

Xiong y Zhu, 2003), promoción de la tolerancia a desecación de semillas y tejidos vegetativos (Finkelstein *et al.*, 2002), inhibición de la fase de transición embrionaria a crecimiento germinativo, y de crecimiento vegetativo a crecimiento reproductivo (Rohde *et al.*, 2000), polinización (Kovaleva y Zakharova, 2003) y senescencia (Hunter *et al.*, 2004).

Giberelinas: generalidades, biosíntesis y funciones fisiológicas

Las GAs son compuestos naturales de las plantas superiores que participan como actores importantes en la modulación y regulación de un amplio espectro de procesos del crecimiento y desarrollo. Respecto a su estructura química, las GAs son diterpenos tetracíclicos ácidos con un esqueleto básico formado por un anillo de *ent*-giberelano (Fig. 6). Existen más de 121 GAs, la mayoría de ellas aisladas de vegetales superiores; sin embargo, sólo un grupo pequeño tienen actividad biológica: GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇.

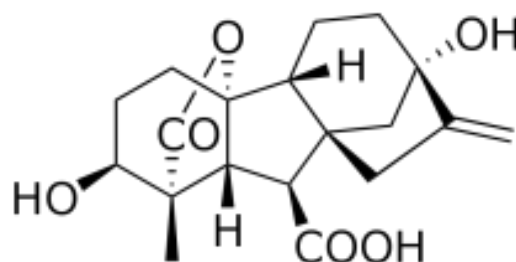


Figura 6. Estructura química de GA₁ (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 2000).

En plantas superiores la biosíntesis de GAs puede ser dividida en tres etapas: I) biosíntesis de *ent*-kaureno a partir de geranyl geranyl difosfato (GGDP) en plastidios, II) conversión de *ent*-kaureno a GA₁₂, y III) formación de GAs C-19 y GAs C-20 en el citoplasma. El GGDP es convertido a *ent*-kaureno a través de dos reacciones catalizadas por las enzimas *ent*-copalil difosfato sintasa (CPS) y *ent*-kaureno sintasa (KS). En la segunda etapa el *ent*-kaureno es convertido a GA₁₂ a través de reacciones secuenciales de oxidaciones, seguida de una posterior contracción del anillo β a través de la acción de las enzimas *ent*-kaureno-oxidasa (KO) y ácido *ent*-kaurenoico oxidasa (KAO). El metabolismo posterior de GA₁₂ puede variar entre especies. En general, GA₁₂ incorpora un grupo hidroxilo en el C-13 para transformarse en GA₅₃, primer miembro de la vía de síntesis de la 13-hidroxilación. Posteriormente, el C-20 de la GA₅₃ sufre dos oxidaciones sucesivas para dar GA₄₄ y GA₁₉. Con la eliminación del C-20 de GA₁₉ se sintetiza GA₂₀, siendo ésta la primera GA de C-19 de la vía, la cual mediante la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición

3 β origina GA₁, compuesto con alta actividad biológica en plantas superiores. Por otra parte, a partir de GA₂₀ se puede originar GA₃ (bioactiva) a través de GA₅. En adición, GA₁₂ puede ser convertida a GA₄ (bioactiva) a través de una oxidación en el C-20 y C-3 (Fig. 7). Las GAs activas pueden finalmente inactivarse mediante la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 2 β o por conjugación, principalmente con glucosa (Yamaguchi, 2008; Sun, 2008). Recientemente, dos nuevos mecanismos de desactivación fueron identificados: epoxidación de GAs en arroz (Zhu *et al.*, 2006) y metilación en *Arabidopsis* (Varbanova *et al.*, 2007).

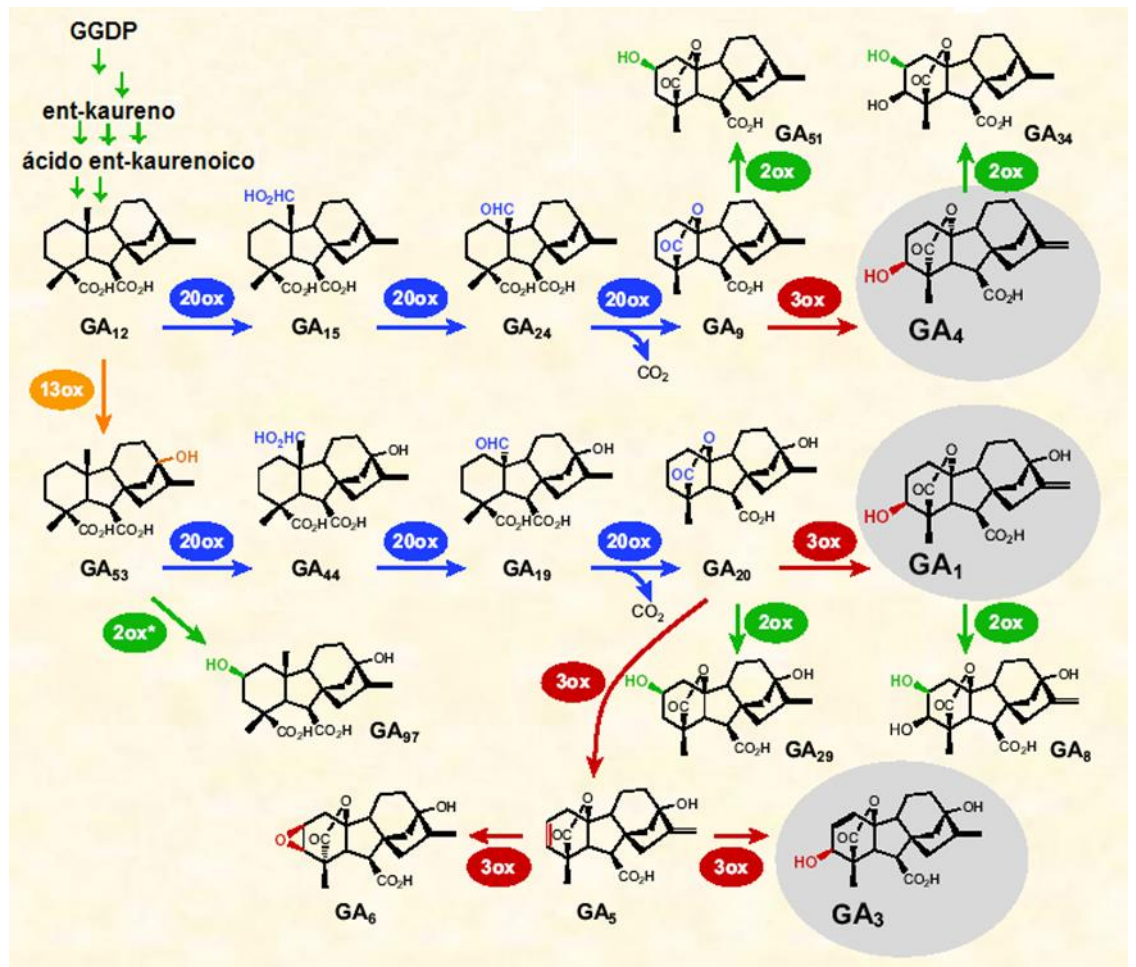


Figura 7. Biosíntesis de GAs (Adaptado de Sun, 2008).

Las GAs están involucradas en una gran diversidad de funciones durante el crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas. Entre sus efectos fisiológicos se pueden mencionar la regulación de la elongación del tallo, la inducción de la partenocarpia, la promoción de la floración en algunas especies, la hidrólisis de sustancias de reserva en cereales -a partir de la síntesis y liberación de enzimas hidrolíticas- y cuajado de frutos, entre

otros (Richards *et al.*, 2001; Gubler *et al.*, 2002; Ogawa *et al.*, 2003; Serrani *et al.*, 2007; Yamaguchi, 2008).

Rol de ABA y GAs en la germinación y dormición de semillas

La comprensión de los mecanismos de control hormonal de la germinación y dormición es importante para los estudios de mejoramiento en el establecimiento de los cultivos y su rendimiento.

Las fitohormonas controlan los procesos involucrados con la actividad de la semilla, actuando como medidores entre la semilla y los factores externos (Linkies y Leubner-Metzger, 2012). En los tejidos seminales, la acción antagónica de ABA y GAs en germinación y dormición debe considerarse a fin de comprender dichos procesos (Chen *et al.*, 2008). En este sentido, ABA induce y mantiene la dormición, actuando como regulador negativo de la germinación (Kucera, 2005) e impidiendo la imbibición en las etapas tempranas de la germinación y la expansión celular (Weitbrecht, 2011). Por el contrario, las GAs están involucradas en la liberación de la dormición, y por lo tanto promueven la germinación junto a otras hormonas tales como Etileno y brasinoesteroides (Kucera, 2005). En particular, el balance ABA:GAs juega un rol central en el control de la dormición-germinación (Feurtado y Kermodé, 2007; Yamaguchi, 2008). En adición al contenido endógeno, en numerosas especies la transición del estado dormido a no dormido se caracteriza por una disminución en la sensibilidad a ABA y un incremento en la sensibilidad a GAs (Corbineau *et al.*, 2002; Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Chiwocha *et al.*, 2005).

HIPÓTESIS

1. Los niveles endógenos de ABA y GAs difieren cuantitativamente en embriones de semillas de girasol de líneas endocriadas dormidas y no dormidas luego de su almacenamiento bajo diferentes condiciones, lo que a su vez incide en la capacidad germinativa.
2. Los niveles endógenos de ABA y GAs difieren cuantitativamente en embriones de semillas de girasol de líneas endocriadas dormidas y no dormidas durante el proceso de imbibición temprana.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios en los niveles endógenos de ABA, GA₁ y GA₃ en embriones de semillas secas y embebidas de girasol luego de su almacenamiento a diferentes tiempo post-cosecha.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles endógenos de ABA, GA₁ y GA₃ en embrión de semillas secas de girasol de una línea endocriada dormida (B123) y no dormida (B91).
2. Cuantificar los niveles endógenos de las fitohormonas antes mencionadas en embriones de girasol de las líneas endocriadas B123 y B91 durante la imbibición temprana.
3. Relacionar los niveles hormonales endógenos con la capacidad germinativa de las semillas de ambas líneas luego de su almacenamiento a diferentes tiempos post-cosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Material vegetal y condiciones de almacenamiento

Semillas de girasol de dos líneas endocriadas: dormida (B123) y no dormida (B91) fueron provistas por EEA-INTA Manfredi. Inmediatamente luego de la cosecha a campo, parte de estas semillas se almacenó a -20°C a fin de conservar su grado de dormición; y otra parte fue almacenadas a temperatura ambiente (25°C) por el término de 33 días a fin de que pierdan su dormición. Se trabajó con dos condiciones: tiempo post-cosecha: 0 y 33 días a 25°C (temperatura ambiente).

Obtención de embrión para las determinaciones hormonales

A- Tiempo 0 ds. post-cosecha

B- Tiempo 33 ds. post-cosecha y temperatura 25°C

I- Semillas Secas (para A y B): El embrión de veinticinco (por repetición) semillas de las líneas dormida y no dormida se separó de las semillas. Posteriormente se congeló en N_2 líquido, liofilizó y conservó a -20°C hasta su posterior uso. Las experiencias se realizaron por cuadruplicado.

II- Semillas embebidas (para A y B): Veinticinco semillas (por repetición) de las líneas dormida y no dormida se sembraron en bandejas de plástico entre toallas de papel húmedo y se colocaron a germinar en condiciones ambientales generadas por una cámara de crecimiento programada con 8 h de oscuridad a 20°C y 60% de HR y 16 h de luz ($130\ \mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$) a 27°C y 60% de HR. A las 3, 6, 12, 18 y 24 hs de imbibición se recolectaron las semillas y se separó el embrión.

Extracción y cuantificación de hormonas

Los niveles hormonales de ABA y GAs fueron determinados en embrión de semillas secas y embebidas de las líneas dormida y no dormida.

La extracción y purificación de las hormonas vegetales se llevó a cabo según protocolo de Durgbanshi *et al.* (2005) con modificaciones. 200 mg de peso seco de embriones se homogeneizaron con N₂ líquido y 5 ml de agua deionizada (solvente de extracción). Se agregaron estándares internos deuterados correspondientes a las diferentes hormonas. Cada muestra se pasó por ultraturrax durante 40 seg para completar la homogeneización y equilibración de estándares. Luego se centrifugó 15 min a 5000 rpm. Se recogió el sobrenadante ajustándose el pH a 2,8 con ácido acético 15%. Posteriormente se realizó una doble partición con éter etílico, se recogieron las fases orgánicas y se llevaron a sequedad. 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.), y se secaron bajo vacío a temperatura ambiente en SpeedVac. La cuantificación de estos compuestos se realizó mediante 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) equipado con una bomba cuaternaria con auto inyector de muestra. Se utilizó una columna Resteck C₁₈ (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 H₂O (solvente B)/ MeOH (solvente A) a una velocidad de flujo de 200 µl min⁻¹, 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 del sistema y columna. A continuación, la identificación y cuantificación de las hormonas correspondientes se realizó mediante un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo (Micromass Quatro Ultimatm PT, Manchester City, UK). Todos 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. La adquisición de datos por MRM se realizó por monitoreo de iones parentales y transiciones.

Análisis estadístico

Las experiencias se realizaron utilizando un diseño totalmente aleatorizado con 4 repeticiones. Las diferencias significativas entre medias de las variables evaluadas en semillas provenientes de líneas dormidas y no dormidas se realizaron mediante el uso de Análisis de la Varianza de una vía (ANNOVA), utilizando 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

Niveles hormonales endógenos en embrión de semillas secas

ABA, GA₁ y GA₃ fueron detectados en embrión de semillas secas de las líneas B123 y B91. Los niveles endógenos variaron según el tiempo de almacenamiento. A los 0 días post-cosecha, ABA presentó los mayores niveles endógenos. En la línea B91 se observaron menores niveles de este compuesto respecto a la línea B123. GA₁ y GA₃ no presentaron diferencias significativas entre líneas (Fig. 8).

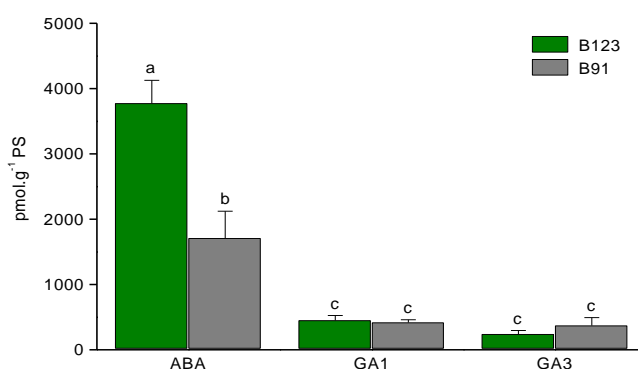


Figura 8. Niveles endógenos de ABA, GA₁ y GA₃ (pmol.g⁻¹ PS) en embrión de semillas secas de girasol de las líneas B123 y B91 a 0 días post-cosecha (n=4 ± SE).

A los 33 días post-cosecha a 25°C±1°C, el compuesto mayoritario fue GA₃ en la línea B91; mientras que ABA y GA₁ no presentaron diferencias significativas entre líneas (Fig. 9).

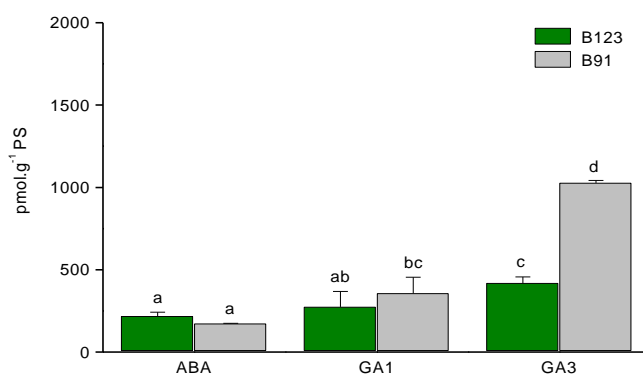


Figura 9. Niveles endógenos de ABA, GA₁ y GA₃ (pmol.g⁻¹ PS) en embrión de semillas secas de girasol de las líneas B123 y B91, almacenados por 33 días post-cosecha a 25°C±1°C (n=4 ± SE).

Diferencias en los niveles endógenos de los compuestos analizados se observaron a ambos tiempos post-cosecha. A cosecha (0 días) los valores de ABA fueron mayores en ambas líneas respecto a los 33 días post-cosecha (B123: 1,73 veces, B91: 9,8 veces). GA₁ presentó los menores niveles, mientras que GA₃ mostró una tendencia opuesta (Figs. 8, 9).

Niveles hormonales endógenos en embrión de semillas embebidas

A los 0 días post-cosecha, el nivel de ABA en embrión mostró variaciones en ambas líneas en las primeras horas de imbibición. En la línea B123 se observó un pico significativo a las 3 horas de imbibición, disminuyendo notablemente a tiempos de imbibición posteriores. En la línea B91 los niveles de ABA no presentaron diferencias significativas a 0, 3 y 6 horas de imbibición, posteriormente disminuyeron significativamente y alcanzaron los niveles de la línea B123. La línea B123 presentó mayores niveles de ABA respecto a la B91 a las 0 y 3 horas de imbibición (0 horas: 2,2 veces, 3 horas: 2,7 veces). (Fig.10).

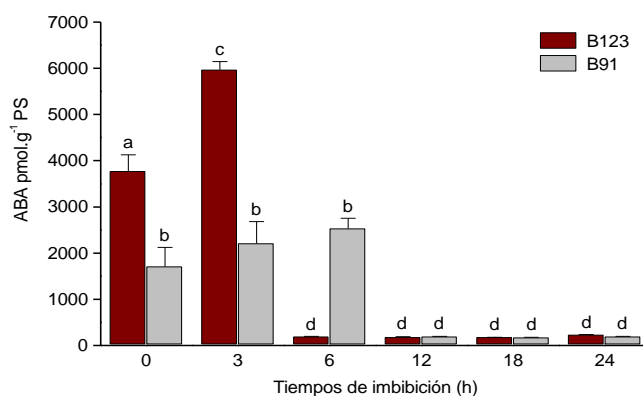


Figura 10. Niveles endógenos de ABA (pmol.g⁻¹ PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a 0 días post-cosecha (n=4 ± SE).

A los 33 días post-cosecha a 25°C±1°C, los mayores niveles de ABA se obtuvieron a las 0 horas de imbibición para la línea B123, mostrando diferencias significativas con la B91. En las restantes horas de imbibición no se registraron diferencias significativas en los niveles de ABA, como así tampoco entre líneas (Fig. 11).

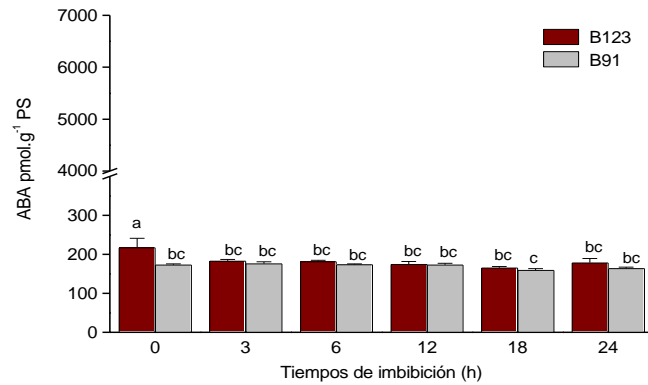


Figura 11. Niveles endógenos de ABA (pmol.g^{-1} PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición, almacenados por 33 días post-cosecha a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ($n=4 \pm \text{SE}$).

Al comparar ambos tiempos post-cosecha, a 0 días se cuantificaron mayores niveles de ABA en ambas líneas a las 0 y 3 horas de imbibición. Mientras que en los tiempos de imbibición posteriores los niveles hormonales fueron menores (Figs. 10, 11).

Respecto a GA_1 , a los 0 días post-cosecha en ambas líneas se observó un incremento a las 3 h de imbibición, para luego disminuir a las 6 horas. Posteriormente, un segundo pico de incremento se detectó a las 12 horas en ambas líneas, manteniéndose ese nivel en la línea no dormida hasta las 18 horas de imbibición. En la línea B123 una disminución abrupta y significativa de GA_1 se evidenció a partir de las 18 horas post-imbibición (Fig. 12).

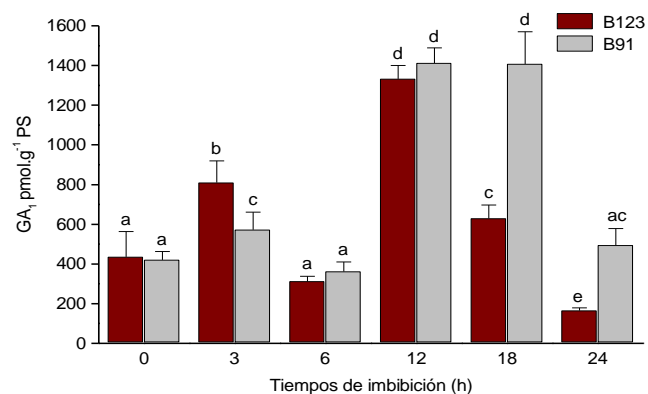


Figura 12. Niveles endógenos de GA_1 (pmol.g^{-1} PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha ($n=4 \pm \text{SE}$).

A los 33 días post-cosecha a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, GA_1 presentó mayor acumulación a las 12 horas en la línea B91, disminuyendo gradualmente a horas posteriores. La línea B123 presentó niveles variables a los diferentes tiempos de imbibición, siendo sus niveles menores que los de la línea B91 a partir de las 12 hasta las 24 horas post-imbibición (Fig.13).

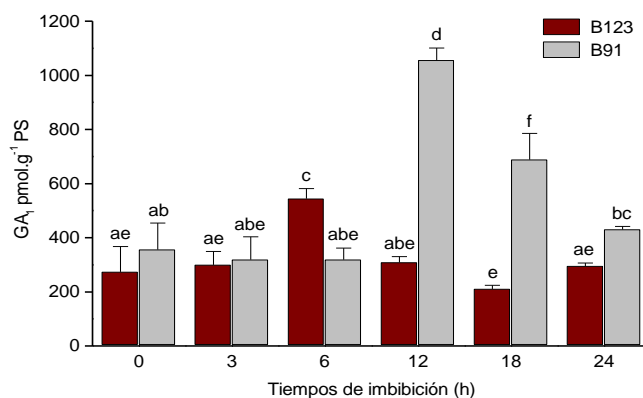


Figura 13. Niveles endógenos de GA_1 (pmol.g^{-1} PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición, almacenados por 33 días post-cosecha a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ($n=4 \pm \text{SE}$).

En general, en la línea B91 se observó mayor acumulación de GA_1 (12 y 18 horas de imbibición) para ambos tiempos post-cosecha, sin embargo los niveles endógenos superiores a los 0 días post-cosecha. Por el contrario, en la línea B123 el pico de acumulación se registró sólo a los 0 días post-cosecha (12 horas de imbibición) (Figs. 12, 13).

Respecto a GA_3 , a los 0 días post-cosecha los niveles endógenos de ambas líneas no mostraron diferencias significativas durante los primeros tiempos de imbibición (0, 3 y 6 h). La mayor acumulación se presentó a las 12 horas de imbibición en la línea B91, para luego disminuir gradualmente hasta las 24 h. La línea B123 presentó menores niveles endógenos respecto a B91 a las 12 y 18 horas de imbibición. Sin embargo a las 24 horas no se observaron diferencias significativas en GA_3 entre ambas líneas (Fig. 14).

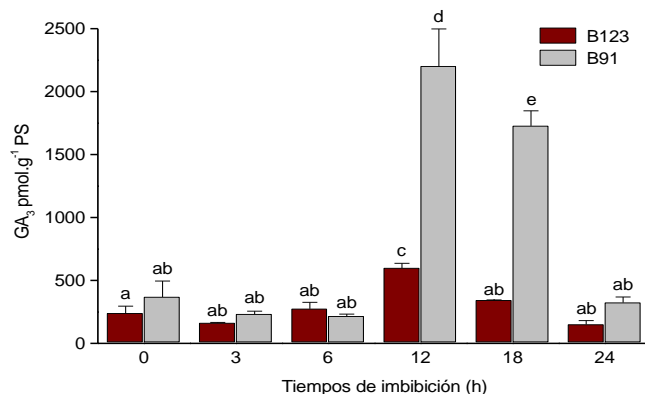


Figura 14. Niveles endógenos de GA₃ (pmol.g⁻¹ PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha (n=4 ± SE).

A los 33 días post-cosecha a 25°C±1°C, la mayor acumulación de GA₃ se observó en la línea B91 durante las 3 primeras horas de imbibición, para luego disminuir significativamente a partir de las 6 horas hasta el final del experimento. En la línea B123, los niveles de GA₃ fueron menores a los de la línea B91 y fluctuaron a lo largo del experimento (Fig. 15).

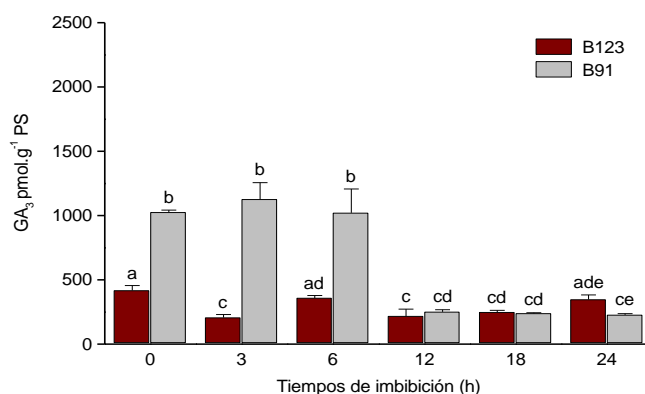


Figura 15. Niveles endógenos de GA₃ (pmol.g⁻¹ PS) en embrión de semillas de girasol de las líneas B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición, almacenados por 33 días post-cosecha a 25°C±1°C (n=4 ± SE).

Al comparar ambos tiempos post-cosecha, en la línea B91 se observó que el pico de acumulación de GA₃ fue mayor a los 0 días post-cosecha, mientras que a los 33 días se produjeron los niveles más altos durante las primeras horas post-imbibición (0 días post-cosecha: 12 y 18 h de imbibición; 33 días post-cosecha: 0, 3 y 6 h de imbibición) (Figs. 14, 15).

DISCUSIÓN

La dormición de las semillas es una de las características adaptativas más importantes de las plantas, que permite a las semillas evitar ambientes desfavorables para la germinación. En este sentido, la dormición en semillas de girasol es una característica indeseable, ya que ocasiona retrasos en la germinación, en el establecimiento de plántula y por ende, conlleva a dificultades en su comercialización (Maiti *et al.*, 2006).

ABA es un regulador negativo en el control de la germinación de semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En este sentido, los altos niveles endógenos de ABA detectados en embrión de la línea B123 (dormida) respecto a embrión de la línea B91 (no dormida) a los 0 días post-cosecha serían responsables de la imposición de la dormición en B123. De hecho, en esta línea se registró 0% de germinación, mientras que la línea B91 presentó aproximadamente un 100 % a los 0 días post-cosecha (Kovacevich, 2012). Al momento de cosecha, el contenido de ABA producido por los tejidos del cigoto durante la maduración tardía sería responsable de imponer la dormición primaria en las semillas (Koornneef *et al.*, 1989; Frey *et al.*, 2004). En efecto, el estado de dormición está usualmente asociado con altos niveles de ABA (Nambara *et al.*, 2010; Linkies y Leubner-Metzger, 2012). Por ejemplo, semillas de *Arabidopsis* del ecotipo dormido Cape Verde Island (Cvi) presentaron mayores niveles endógenos de ABA comparado con el ecotipo no dormido Columbia (Col) (Preston *et al.*, 2009). Asimismo, semillas recién cosechadas de mutantes ABA-deficientes de *Arabidopsis*, tomate (*Solanum lycopersicon*) y tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia*) no presentaron dormición (Grappin *et al.*, 2000).

El proceso por el cual la semilla seca madura pierde su condición de dormida luego de un período de almacenamiento en condiciones secas es denominado “*after-ripening*” (Holdsworth *et al.*, 2008). Este proceso estaría en relación con una disminución en la sensibilidad a ABA y/o con un incremento en la sensibilidad a hormonas promotoras de la germinación, tales como GAs. Sin embargo, no sólo es importante la sensibilidad particular del tejido, sino también el contenido endógeno hormonal (Cadman *et al.*, 2006). En este sentido, a los 33 días post-cosecha cuando B123 y B91 presentaron un porcentaje de germinación similar (Kovacevich, 2012), los niveles de ABA en embrión de semilla seca fueron semejantes entre ambas líneas, hecho que indicaría que una disminución de ABA en embrión de la línea dormida B123 fue necesaria para que la germinación se desencadene. De hecho, la pérdida de dormición en semillas de *Arabidopsis* y cebada por “*after-ripening*” está asociada con una disminución de ABA, lo cual ocurre mayoritariamente a través de la activación transcripcional de enzimas que codifican para

ABA-8'-hidroxilasa (Okamoto *et al.*, 2006). Así, aunque la evidencia es fragmentaria, diferentes investigaciones indican que cambios transcripcionales, post-transcripcionales y transduccionales pueden ocurrir durante el “after-ripening” de tabaco (Leubner-Metzger, 2005), *Arabidopsis* (Müller *et al.*, 2009) y cebada (Leymarie *et al.*, 2007).

Ha sido ampliamente propuesto que GAs estimulan la germinación contrarrestando la acción de ABA (Linkies *et al.*, 2009; North *et al.*, 2010). En el presente trabajo, los altos niveles de GA₃ detectados en embrión de semillas secas de ambas líneas a los 33 días post-cosecha se correlacionaron con la pérdida de dormición de B123 y un porcentaje de germinación similar a la línea B91 (Kovacevich, 2012). Por lo tanto, los niveles de GA₃ en semillas secas indicarían su relevancia en la pérdida de dormición de las semillas. No obstante, los niveles hormonales endógenos, las vías de señalización y la interacción entre distintas fitohormonas también desempeñan un importante rol tanto en el estado fisiológico de la semilla así como en la regulación del proceso de germinación (Kucera *et al.*, 2005; Finkelstein, 2013).

Durante el proceso de imbibición, los niveles endógenos de ABA y GAs en embriones de girasol fluctuaron durante el transcurso de los tiempos analizados. De hecho, cambios en el contenido de diversas fitohormonas tales como jasmonatos, ácido indol-3-acético, ABA y ácido salicílico fueron detectados durante la fase de imbibición temprana en semillas de *Arabidopsis* (Preston *et al.*, 2009).

Por otro lado, en varias especies tales como *Arabidopsis* (Ali-Rachedi *et al.*, 2004), lechuga (Goani *et al.*, 2004), cebada (Jacobsen *et al.*, 2002) y tabaco (Grappin *et al.*, 2000), el grado de dormición está relacionado con el nivel endógeno de ABA en la semilla embebida más que con su nivel en la semilla seca. Preston *et al.* (2009) reportaron diferencias en el contenido de ABA entre el ecotipo no dormido Columbia (Col) y el ecotipo dormido Cape Verde Island (Cvi) de *Arabidopsis*. En este sentido, en girasol las diferencias detectadas en los niveles de ABA entre las líneas B91 (no dormida) y B123 (dormida) en el transcurso de la imbibición sugieren una regulación diferencial del metabolismo de ABA durante este proceso. De hecho, durante la imbibición, el mantenimiento de la dormición y la germinación pueden estar regulados tanto por el catabolismo como por la neo-síntesis de ABA (Arc *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la síntesis *de novo* de ABA es necesaria para el mantenimiento de la dormición de semillas de diversas especies tales como *Nicotiana plumbaginifolia* (Grappin *et al.*, 2000) y *Arabidopsis* (Finkelstein *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). Así, el incremento en los niveles de ABA detectados en la línea B123 (dormida) durante la imbibición a los 0 días post-cosecha confirmaría los resultados obtenidos en girasol por Le Page-Degivry y Garelo (1992).

Una disminución en los niveles de ABA durante las etapas tempranas de la imbibición ha sido reportada tanto en semillas dormidas como no dormidas de varias especies (Preston *et al.*, 2009). En relación a esto, los resultados de este trabajo muestran un descenso en los niveles de la hormona en la línea no dormida (B91) durante la imbibición temprana, hecho que podría indicar una disminución en la síntesis de ABA y/o una activación de su catabolismo. Esta dinámica estaría reflejando lo observado para otras especies tales como tabaco (Grappin *et al.*, 2000), lechuga (Chiwocha *et al.*, 2003) y cebada (Jacobsen *et al.*, 2002), en las cuales se informó un descenso de ABA para dar comienzo a la germinación.

A los 0 días post-cosecha el aumento en el contenido endógeno de GAs biológicamente activas (GA_1 y GA_3) detectado a las 12 h de imbibición en embrión de la línea B91 coincidió con lo informado por Roselló (2013), quien reportó un notorio incremento en la expresión del gen que codifica para la síntesis de la enzima catabólica GA2-ox en la misma línea. Este incremento en el catabolismo concuerda con un aumento en la biosíntesis de las GAs activas, indicando que existiría una fina regulación en la concentración de GAs bioactivas que efectivamente actuaría como señal desencadenante de la germinación en la línea B91. En este sentido, ha sido demostrado que la aplicación de GAs estimula la transcripción de genes que codifican enzimas que desactivan a GAs -como es el caso de GA2ox- generando una regulación por retroalimentación (Olszewski *et al.*, 2002).

A los 33 días post-cosecha, una disminución en el balance hormonal ABA:GAs durante la imbibición se correlacionó con el alto porcentaje de germinación en la línea B123 (Kovacevich, 2012). Esto indicaría la significación del balance hormonal como factor involucrado en la etapa de imbibición temprana en girasol. De hecho, ha sido propuesto que cambios en el balance ABA:GA están involucrados en la expresión de la dormición (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009; Finkelstein, 2013).

Por otra parte, la importancia relativa de GA_3 y GA_1 se evidenció durante la imbibición temprana de semillas de la línea B91 almacenadas durante 33 días a temperatura ambiente. Más aún, una dinámica diferente fue observada entre ambas GAs; GA_3 estaría involucrada en procesos iniciales de la imbibición (3 y 6 h), mientras que GA_1 estaría más relacionada con procesos que ocurren tardíamente durante la imbibición (12, 18 y 24 h). Ha sido indicado que existe una íntima interacción entre el metabolismo de GAs y el camino de transducción de su señal. Este tipo de interacción, conjuntamente con el de otras fitohormonas, se traduce en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Miransari y Smith, 2014). En este sentido, el elevado nivel de GAs en etapas tardías podría relacionarse con el inicio del crecimiento del eje embrionario. Ayele *et al.* (2012) han hipotetizado que altos niveles de GA_1 en eje embrionario

son responsables de los elongados y delgados entrenudos observados durante el crecimiento temprano de plántulas del mutante slender *sln*. Asimismo, GA₃ activa diversos procesos asociados con la germinación tales como aflojamiento de la cubierta seminal, expansión y desarrollo del embrión y movilización de las sustancias de reserva (Finkelstein *et al.*, 2008).

En síntesis, este trabajo demostró que los niveles endógenos de ABA y GAs biológicamente activas difieren cuantitativamente en relación al tiempo y temperatura de almacenamiento, como así también durante el proceso de imbibición en eje embrionario de semillas de las dos líneas endocriadas de girasol, B123 y B91.

CONCLUSIONES

- Los niveles endógenos de ABA y GAs se modificaron de acuerdo al tiempo de almacenamiento y la imbibición de las semillas.

- A cosecha (0 días), los altos niveles endógenos de ABA detectados en embrión de la línea B123 (dormida) -respecto a embrión de la línea B91 (no dormida)- son responsables de la imposición de la dormición en esta línea.

- El incremento en los niveles de ABA detectados durante la imbibición de semillas de la línea B123 al momento de cosecha es responsable del mantenimiento de la dormición.

- La dinámica de acumulación de GAs durante la imbibición de semillas de la línea B91 almacenadas por 33 días indicaría que GA_3 está involucrada en procesos iniciales de la germinación, mientras que GA_1 lo estaría en procesos tardíos.

- A los 33 días post-cosecha, los altos niveles de GA_3 detectados en embrión de semillas secas de ambas líneas respecto a ABA se relacionaron con un alto porcentaje de germinación en ambas líneas, indicando la importancia relativa del balance hormonal entre estas fitohormonas para el control de dicho proceso.

BIBLIOGRAFIA

- AGRAWAL, G.K., M. YAMAZAKI, M. KOBAYASHI, R. HIROCHIKA, A. MIYAO y H. HIROCHIKA. 2001. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon *Tos17* insertion: tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel *OsTATC* gene. *Plant Physiol.* 125: 1248-1257.
- 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.
- ARC, E., J. SECHET, F.CORBINEAU, L. RAJJOU y A. MARION POLL. 2013. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Plant Sci.* 4: 63.
- AYELE, B.T., J.A. OZGA, A.D. WICKRAMARATHNA y D.M. REINECKE. 2012 Gibberellin metabolism and transport during germination and young seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Plant Growth Regul.* 31: 235-252.
- AZCÓN-BIETO, J. y TALÓN M. 2000. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Mc Graw-hill/interamericana de España, S. A. U. Edicions universitat de Barcelona. España. 326 p.
- BASKIN, C.C., y J.M. BASKIN. 2004. Determining dormancy-breaking and germination requirements from the fewest seeds. En: *Strategies for Survival*. Guerrant, E., K. Havens y M. Maunder (Eds.), Island Press, Washington. p: 162-179.
- BIGLER, D. 2014. Consideraciones generales para el cultivo de Girasol En <http://www.buenastareas.com/ensayos/El-Girasol/3666277.html> . Consultado: 25-03-2014.
- 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.
- CHEN, S.-Y., KUO S.-R. y CHIEN C.-T..2008. Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds. *Tree Physiol.* 28: 1431-1439.
- CHENG, W.-H., A. ENDO, L. ZHOU, J. PENNY, H.-C. CHEN, A. ARROYO, P. LEON, E. NAMBARA, T. ASAMI, M. SEO, T. KOSHIBA y J. SHEEN. 2002 A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* 14: 2723-2743.
- CHIWOCHA, S., CUTLER, A., ABRAMS, S.R., AMBROSE, S.J., YANG, J., ROSS, A.R.S. y A.R. KERMODE. 2005. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid,

auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J.* 42: 35-48.

CHIWOCHA, S., ABRAMS, S., AMBROSE, S., CUTLER, A., LOEWEN, A., ROSS, A. y A. KERMODE. 2003. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J.* 35: 405-417.

CONTRERAS, S. 2012. Seed Dormancy. En: <http://seedbiology.osu.edu>. Consultado: 22-04-2013.

CORBINEAU, F, C. GAY-MATHIEU, D VINEL y D CÔME. 2002. Decrease in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. *Physiol. Plant* 116: 489-496.

DE OLLAS, C., B. HERNANDO, V. ARBONA y A. GOMEZ CADENAS. 2013. Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiol Plant.* 147: 296-306.

DIAZ ZORITA, M., G. A. DUARTE y E. PLANTE. 2003. El Cultivo de Girasol. ASAGIR.

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. Agr Food Chem.* 53: 8437-8442.

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: *Seed Development, Dormancy and Germination*. Bradford K. y H. Nonogaki (Eds). Annual Plants Reviews 27. Blackwell Publishing, Oxford. p: 176-223.

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

FINKELSTEIN, R. 2013. *Abscisic acid synthesis and response*. The Arabidopsis Book 11: 1-36.

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

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

- FREY, A., B. GODIN, M. BONNET, B. SOTTA y A. MARION-POLL. 2004. Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 218: 958-964.
- GOANI, T., S. KAWAHARA, M. TOUGOU, S. SATOH, T. HASHIBA, N. HIRAI, H. KAWAIDE, Y. KAMIYA y T. YOSHIOKA. 2004. Abscisic acid in the thermo-inhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *J. Exp. Bot.* 55: 111-118.
- GRAPPIN, P., D. BOUINOT, B. SOTTA, E. MIGINIAC y M. JULLIEN. 2000. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* 210: 279-285.
- GUBLER, F, P. CHANDLER, R. WHITE, D. LLEWELLYN, J. JACOBSEN. 2002. GA signaling in barley aleurone cells: control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.* 129: 191-200.
- HOLDSWORTH, M.J., L. BENTSINK y W.J.J. SOPPE 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist.* 179: 33-54.
- HUNTER, D.A., A. FERRANTE, P. VERNIERI y M.S. REID. 2004. Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* “Dutch Master”). *Physiol. Plant.* 121: 313-321.
- JACOBSEN, J.V., D.W. PEARCE, A.T. POOLE, R.P. PHARIS, y L.N MANDER. 2002. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiol. Plant.* 115: 428-441.
- JUNG, J. H. y C. M. PARK.2011. Auxin modulation of salt stress signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Signal Behav.* 6: 1198-1200.
- KOORNNEEF, M., L. BENTSINK y H. HILHORST. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36.
- KOORNNEEF, M, C.J. HANHART, H. HILHORST y C.M. KARSSSEN. 1989. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 90: 463-469.
- KOVACEVICH, N. 2012. *Estudio hormonal en la dormición de semillas de dos líneas endocriadas de girasol (Helianthus annuus L.)*. Trabajo final de grado. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto.

- KOVALEVA, L.V. y E.V. ZAKHAROVA. 2003. Hormonal status of the pollen-pistil system at the programic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* (L.). *Sex Plant Reprod.* 16: 191-196.
- 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.
- LE PAGE-DIGIVRY, M.T. y G. GARELLO. 1992. In situ abscisic acid synthesis: a requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus*. *Plant Physiol.* 98: 1386-1390.
- LEE, K.P., U. PISKUREWICZ, V. TURECKOVÁB, M STRNADB y L. LOPEZ-MOLINA. 2010. A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in *Arabidopsis* dormant seeds. [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*](#) 107: 19108-19113.
- 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., E. BRUNEAUX, S. GIBOT-LECLERC y F. CORBINEAU. 2007. Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *J. Exp. Bot.* 58: 425-437.
- 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.
- LINKIES, A, K. MÜLLER, K. MORRIS, V. TUREČKOVÁ, C.S.C. CADMAN, F. CORBINEAU, M. STRNAD, JR. LYN, W.E. FINCH-SAVAGE y G. LEUBNER-METZGER 2009. Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 3803-3822.
- 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.
- MANUGISTICS. 1997. Statgraphics plus for Windows 3.0. Manugistics, Rockville, Maryland, USA.
- MINAGRI. 2013. Sistema integrado de información Agropecuaria. En: <http://www.siiia.gov.ar/series>. Consultado: 12-06-2013.
- MIRANSARI, M. y D.L. SMITH. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99: 110-121.

- MÜLLER, K., A.C. CARSTENS, A. LINKIES, M.A., TORRES G. y G. LEUBNER-METZGER. 2009. The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening. *New Phytologist*. 184: 885-897.
- NAMBARA, E., M. OKAMOTO, K. TATEMATSU, R. YANO, M. SEO y Y. KAMIYA. 2010. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci. Res.* 20: 55-67.
- NAMBARA, E. y MARION-POLL, A. 2005. Abscisic Acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 56: 165-185.
- NORTH, H., S. BAUD , I. DEBEAUJON , C. DUBOS , B. DUBREUCQ , P. GRAPPIN, M JULLIEN, L. LEPINIEC, A. MARION-POLL, M. MIQUEL, L. RAJJOU, J.M. ROUTABOUL y M. CABOCHE. 2010. *Arabidopsis* seed secrets unravelled after a decade of genetic and omics-driven research. *Plant J.* 61: 971-981.
- NORTH, H.M., A. DE ALMEIDA, J.P. BOUTIN, A. FREY, A. TO, L. BOTRAN., B. SOTTA y A. MARION-POLL. 2007. The *Arabidopsis* ABA deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J.* 50: 810-824.
- OGAWA, M, A. HANADA, Y. YAMAUCHI, A. KUWAHARA, Y. KAMIYA y S. YAMAGUCHI. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* 15:1591-604.
- OKAMOTO, M., A. KUWAHARA, M. SEO, T. KUSHIRO, T. ASAMI, N. HIRAI, Y. KAMIYA, T. KOSHIBA, y E. NAMBARA. 2006. CYP707A1 and CYP707A2, which encode Abscisic Acid 8#-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141: 97-107.
- OLSZEWSKI, N., T. SUN y F. GUBLER. 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*: S61-S80.
- PASCALE, N. y E. DE LA FUENTE. 1987. Producción de girasol. En: *Cuaderno de actualización técnica*. Buenos Aires. Argentina. Nº 40. 191p.
- PRESTON, J., K. TATEMATSU, Y. KANNO, T. HOBO, 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.
- RICHARDS, D.E., K.E. KING, T. AIT-ALI y N.P. HARBERD. 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 67-88.

- RODRÍGUEZ-GACIO, M.C., M.A. MATILLA-VÁZQUEZ y A.J. MATILLA. 2009. Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signal Behav.* 4: 1035-1048.
- ROHDE, A., S. KURUP y M. HOLDSWORTH. 2000. *ABI3* emerges from the seeds. *Trends Plant Sci.* 5: 418-419.
- 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. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.
- ROSELLÓ, P.L. 2013. Análisis de expresión de genes relacionados al metabolismo y señalización del Ácido Abscísico y las Giberelinas en semillas dormidas y no dormidas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Tesis para optar por el título de Licenciada en Genética. Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas Química y Naturales.
- SATORRE, E.H., R.L. BENECH ARNOLD, G.A. SLAFER, E.B. De la FUENTE, D.J. MILLARES, M.E. OTEGUI y R. SAVIN. 2004. *Producción de granos. Bases funcionales para su manejo.* 2^{da} ed. Ed. Facultad de Agronomía. Bs. As. Argentina. 783 p.
- SCHWARTZ, S.H., Q. XIAOQIONG, J.A.D. ZEEVAART. 2003. Elucidation of the indirect pathway of Abscisic Acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes. *Plant Physiol.* 131: 1591-1601.
- SEKI, M., T.UMEZAWA, K. URANO y K. SHINOZAKI. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 296-302.
- SEO, M., H. AOKI, H. KOIWAI, Y. KAMIYA, E. NAMBARA y T. KOSHIBA. 2004. Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. *Plant Cell Physiol.* 44: 1694-1703.
- SEO, M. y T. KOSHIBA. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7: 41-48.
- SERRANI, J. C., R. SANJUÁN, O. RUIZ-RIVERO, M. FOS, y J. L.GARCÍA-MARTÍNEZ. 2007. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiol.* 145: 246-257.
- 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.
- SUN, T.P. 2008. Gibberellins metabolism, perception and signaling pathways in *Arabidopsis*.. En: *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville. MD. p: 1-28.
- TON, J., V. FLORS, y B. MAUCH-MANI. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14: 310-317.

- TORRETTA, J.P., D. MEDAN, A. ROIG ALSINA y N.H. MONTALDO. 2010. Visitantes florales diurnos del girasol (*Helianthus annuus* L., Asterales: Asteraceae) en la Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69.
- UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA. 2014a. Familia Compuestas. Asteráceas. En: <http://www.euita.upv.es/variados/biologia/TemaAngiospermas/Astéridas/Compuestas.htm>. Consultado: 13-03-2014.
- UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA. 2014b. Botánica. Frutos. Aquenios. En: http://www.euita.upv.es/variados/biologia/web_frutos/Aquenio.htm. Consultado: 14-03-2014.
- VARBANOVA, M., S.YAMAGUCHI, Y. YANG, K. McKELVEY, A. HANADA, R. BOROCHOV, F. YU, Y. JIKUMARU, J. ROSS, D. CORTEZ, C. JE MA, J.P. NOEL, L. MANDAR, V. SHULAEV, Y. KAMIYA, S. RODERMEL, D. WEISS y E. PICHERSKY. 2007. Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell*. 19: 32–45.
- [WEITBRECHT](#), K., [K. MÜLLER](#) y [G. LEUBNER-METZGER](#). First off the mark: early seed germination. *J. Exp. Bot.*: 3289-3309.
- XIONG, L. y J.K. ZHU. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 133: 29-36.
- XU, Z.J., M. NAKAJIMA, Y. SUZUKI y I. YAMAGUCHI. 2002. Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from Adzuki bean seedlings. *Plant Physiol.* 129: 1285-1295.
- YAMAGUCHI, S. 2008. Gibberellin Metabolism and its Regulation . *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225-51.
- YANG, C., J. LIU, X. DONG, Z. CAI, W. TIAN, y X. WANG. 2014. Short-term and continuing stresses differentially interplay with multiple hormones to regulate plant survival and growth. *Mol. Plant* 7: 841-855.
- YE, N., L. JIA y J. ZHANG. 2012. ABA signal in rice under stress conditions. *Rice*. 5: 1.
- ZHU, Y, T. NOMURA, Y. XU, Y. ZHANG, Y. PENG, B. MAO, A. HANADA, H. ZHOU, R. WANG, P. LI, X. ZHU, L. N. MANDER, Y. KAMIYA,S. YAMAGUCHI y Z. HE. 2006. Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* 18: 442-456.