



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Trabajo final presentado para optar al título de Licenciado en Ciencias Biológicas

**“Jasmonatos: su rol en la germinación y dormición de
semillas de girasol”**

Alumno: Alcoba, Juan Cruz

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

Río Cuarto, Córdoba, Argentina
Diciembre 2017

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal,
Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico – Químicas y
Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Tribunal evaluador:

Dr. Sergio Alemán

Dra. Susana Suárez

Dra. Ana Vigliocco

Fecha de presentación: 22 de diciembre de 2017.

Agradecimientos:

Principalmente agradezco a mi familia, por darme la oportunidad de elegir estudiar en esta hermosa universidad, por enseñarme a tener valores y generarme esa sensibilidad por los seres vivos. También me enseñaron a ser honesto, responsable y me dieron las herramientas para ser un tipo crítico y autosuficiente. En estos últimos meses en que hubo una tormenta de emociones, quiero decir: Gracias a mi viejo, del que me siento totalmente orgulloso ya que recientemente me enseñó lo que es ser un luchador y aferrarse a la vida con tanto valor. A mi madre, otro orgullo, una compañera incansable y la mejor madre que uno pudiera pedir. A mi hermano, que siempre supo conciliar situaciones y dar buenos consejos (el mejor compañero de viaje!).

También a la familia grande, mi abuela Helga quien me enseña todos los días lo que es el amor y la compasión a través de sus rezos (este biólogo y evolucionista a menudo duda de la existencia de un dios, pero esos sentimientos que mi abu transmite ¡sí que son reales! Y con eso me alcanza). A todos mis tíos que siempre me alentaron a seguir estudiando y siempre estuvieron ahí en las buenas y en las malas.

También entra en esta familia grande, la familia Galizia-Orlando. Gracias Doctor por cuidar tanto de nosotros y traer al mundo a esos dos amigos del alma que son Ignacio y Matías. Sinceramente espero que todo el mundo descubra en esta vida lo que es tener una amistad tan fuerte, como la que tengo con estos muchachos. Hablando de estos hermanos del alma, quiero agradecer a mi primo Agustín, quien es una de las mejores personas que conozco en este mundo y lo admiro muchísimo.

Gracias a los profes (y al mismo tiempo compañeros) del laboratorio de Fisiología Vegetal, por permitirme trabajar con ustedes, guiarme, tenerme paciencia y sobre todo permitirme manejar mis tiempos con total flexibilidad. Gracias especialmente a mi directora Ana Vigliocco, por la paciencia de oro! También a Andrea Andrade y a Sergio Alemán por darme una mano en todo lo que necesité. Muy contento satisfecho de mi paso por este laboratorio.

Gracias a los compañeros con los que he formado cierta amistad, gracias por reír juntos y compartir tantos buenos momentos, les deseo lo mejor en sus vidas!

Quiero agradecer también a la universidad por darme tanto, y sobre todo también quiero agradecer a aquellos compañeros que en sus tiempos libres, llevando a cuestas sus carreras y vaya a saber qué historias de vida, supieron dedicar su tiempo a la militancia y trabajar tan desinteresadamente en proyectos que nos beneficiaron a todos los estudiantes y también trabajar a favor de la educación pública. Eso es altruismo!

Gracias a todos los docentes que tuve en esta carrera. Algunos quienes me han volado la cabeza con teorías impresionantes y me han dado materias muy interesantes. Y otros que no les ha tocado una materia tan piola, pero que siempre dieron clases con la mejor actitud y con una sonrisa en la cara. Agradezco mucho que mantuvieran vivo en mí ese sentimiento de curiosidad que me impulsó a estudiar esta bellísima carrera. Esa curiosidad que traigo desde pequeño. Mas allá del rol que desempeñe el día de mañana para ganarme la vida, estoy orgulloso y muy contento de poseer hoy en día estos conocimientos tan valiosos.

ÍNDICE

| | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMEN | 1 |
| ABREVIATURAS | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| - El cultivo de Girasol..... | 3 |
| - Descripción botánica..... | 4 |
| - Germinación-Dormición..... | 6 |
| - Fitohormonas: Germinación-Dormición..... | 7 |
| - Jasmonatos: Biosíntesis y funciones..... | 8 |
| - Rol de los JAs en la germinación y dormición de semillas | 10 |
| HIPÓTESIS | 12 |
| OJETIVO GENERAL | 12 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 12 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| - Material vegetal y condiciones de almacenamiento..... | 13 |
| - Obtención de eje embrionario y cotiledones para las determinaciones hormonales | 13 |
| - Extracción, identificación y cuantificación de JAs..... | 13 |
| - Reproducibilidad de las determinaciones y análisis estadístico | 14 |
| RESULTADOS | 15 |
| - Niveles endógenos de OPDA y JA en embriones de semillas de la línea B91..... | 15 |
| - Niveles endógenos de OPDA y JA en embriones de semillas de la línea B123..... | 16 |
| DISCUSIÓN | 19 |
| CONCLUSIONES | 22 |
| BIBLIOGRAFÍA CITADA | 23 |

RESUMEN

Los jasmonatos (JAs) están implicados en la regulación de la germinación y dormición de semillas en diversas especies. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación del ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) y ácido jasmónico (JA) en la germinación y/o dormición de cipselas de girasol de las líneas B123 (con dormición a cosecha) y B91 (sin dormición a cosecha) a los 0 días post-cosecha (para ambas líneas) y 33 días post-cosecha a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (para la línea B123). Veinticinco semillas (por repetición) de ambas líneas fueron sembradas en bandejas de plástico entre toallas de papel húmedo y se colocaron a germinar en condiciones controladas. Las semillas fueron cosechadas a diferentes tiempos de imbibición (0, 3, 6, 12 y 18 h) y posteriormente el embrión fue seccionado en eje embrionario y cotiledones. Los niveles hormonales endógenos se cuantificaron mediante Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas en Tándem (LC-ESI/MS-MS). Los resultados mostraron diferencias en el perfil hormonal de eje embrionario y cotiledones en ambas líneas; observándose mayores niveles hormonales en eje embrionario. A los 0 días post-cosecha, los niveles endógenos de JA y OPDA fueron inferiores en embriones de semillas secas de la línea B123 respecto a la línea B91. En semillas secas de ambas líneas se observó un umbral en los niveles endógenos de OPDA y JA, a partir del cual el proceso de germinación sería desencadenado. Durante la imbibición, un incremento de JA fue observado en eje embrionario de la línea B91, mientras que en la línea B123 no se registraron diferencias significativas en los niveles de OPDA y JA. El almacenamiento en seco por 33 días a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ incrementó los niveles de ambos compuestos en eje embrionario de semillas secas y embebidas de la línea B123. En síntesis, los niveles endógenos de OPDA y JA varían significativamente durante la imbibición y según el tejido analizado, así como también con las condiciones de almacenamiento. Finalmente se observa que los niveles endógenos de OPDA y JA no actuarían como mediadores primarios en la imposición de la dormición de la línea B123, sino que actuarían en su liberación, promoviendo así la germinación de las semillas de girasol.

ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

AOC: óxido de alenociclasa

AOS: óxido de alenosintasa

dnOPDA: dinor-OPDA

ESI-: Electrospray negativo

GAs: giberelinas

HR: Humedad Relativa

MeOH: Metanol

DCA: Diseño completamente aleatorizado

JA: ácido jasmónico

JA-ACC: ácido jasmónico conjugado con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

JA-Ile: ácido jasmónico conjugado con isoleucina

JA-Leu: ácido jasmónico conjugado con leucina

JA-Phe: ácido jasmónico conjugado con fenilalanina

JAs: Jasmonatos

JA-Trp: ácido jasmónico conjugado con triptófano

JA-Val: ácido jasmónico conjugado con valina

LA: ácido linoleico

LC-ESI/MS-MS: cromatografía Líquida- Espectrometría de Masas Tándem

Me-JA: metil-Jasmónico

MGDG: galactolípido monogalactosildiacilglicerol

MRM: Monitoreo de Reacciones Múltiples

OPC-8:0: 3-oxo-pentenilo-ciclopentano-octanoico

OPDA : ácido 12-oxo-fitodienoico

OPRs: OPDA reductasas

9-LOX: 9-lipoxigenasa

11-OH-JA: 11-hidroxi-jasmónico

12-OH-JA: 12-hidroxi-jasmónico

13-HPOT: 13-hidroperóxido de ácido linolénico

13-LOX: 13-lipoxigenasa

INTRODUCCIÓN

El cultivo de girasol

El girasol (*Helianthus annuus* L.), es una especie originaria de América del Norte, de la zona que actualmente ocupa la parte central de los EEUU y el noroeste de México. Las poblaciones nativas americanas lo cultivaban utilizando su semilla como alimento y muy probablemente fabricaban un aceite al que daban diversos usos. A mediados del siglo XVI el girasol fue llevado a España como planta ornamental para posteriormente consumir sus frutos. Finalmente es en el siglo XIX cuando adquirió importancia como oleaginosa, debido a su alto contenido de ácidos grasos no saturados tales como los ácidos oleico y linoleico, y por prácticamente no contener ácido linolénico. Además, el aceite de girasol contiene vitaminas liposolubles como A, D y E -esta última con propiedades antioxidantes-, complejos fosforados y vitaminas B4 y B8. Todas estas características hacen que el aceite de girasol revista importancia para la salud humana. Otro producto obtenido de la molienda de sus semillas es la harina, utilizada como proteína vegetal para la producción de carnes y leche. Actualmente, el girasol es una de las oleaginosas más ampliamente cultivadas en el mundo, siendo Argentina uno de los primeros exportadores mundiales de su aceite, desarrollando una de las más competitivas industrias procesadoras (Andreani, 2004).

En nuestro país, la siembra se realiza en el 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). En el ciclo agrícola 98/99 Argentina se convirtió en el primer exportador mundial de aceite de girasol, sin embargo, a partir del ciclo 11/12 el área y producción de girasol comenzaron a declinar a medida que aumentaba la producción en Rusia y Ucrania (USDA, 2016). En la presente campaña agrícola (16/17) se registró una importante recuperación para el sector con una superficie de 2,0 millones de ha, representando así un crecimiento interanual del 28,9% (MINAGRO, 2017); esto posiciona a nuestro país como el cuarto productor mundial de girasol y el tercer exportador de su aceite luego de Ucrania y Rusia (Oilseed, 2017).

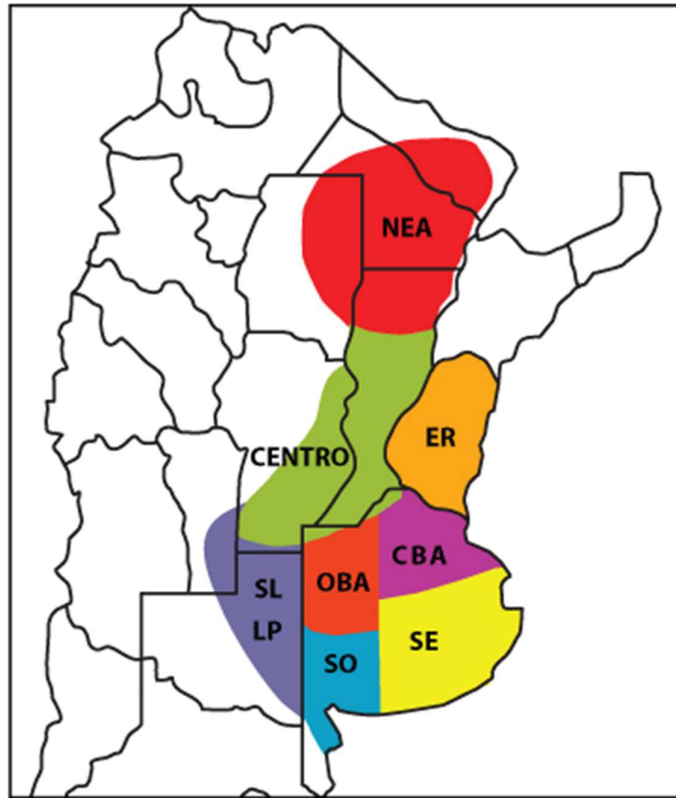


Figura 1. Áreas de producción de girasol en Argentina (ASAGIR, 2017).

Descripción botánica

El girasol pertenece a la familia Asteraceae y al género *Helianthus*, el cual está compuesto por 51 especies nativas de América del Norte. Es una planta herbácea de hasta tres metros de alto con una raíz pivotante, formada por una raíz principal y abundantes raíces secundarias y un tallo recto, simple o ramificado, áspero al tacto. Las hojas son alternas, trinervadas, pecioladas y de formas variables, con márgenes aserrados.

Las flores en el girasol se reúnen en una inflorescencia denominada capítulo, el cual posee dos tipos de flores que se insertan en el receptáculo plano. En la periferia se encuentran las flores liguladas (estériles) con sus láminas oblongas a oblanceoladas, amarillas o anaranjadas; mientras que por dentro de éstas se encuentran las flores tubuladas (fértils) cuyas corolas son a menudo oscuras en la parte apical. Rodeando la circunferencia del capítulo se observan brácteas de forma ovadas a anchamente lanceoladas que recubren a las flores anteriormente descriptas (Fig. 2).



Figura 2. Planta e inflorescencia de girasol (Zuil, 1974).

La “semilla” es botánicamente un fruto seco denominado cipsela. Presenta forma oblonga-ovoide, algo comprimido de 3,5 a 5,5 mm de largo, de color grisáceo y a menudo moteado. El fruto maduro se compone de la verdadera semilla y un pericarpo fibroso y duro. La semilla propiamente dicha se compone de un eje embrionario, cotiledones y una cubierta seminal (Maldonado Zarain, 2003) (Fig. 3).

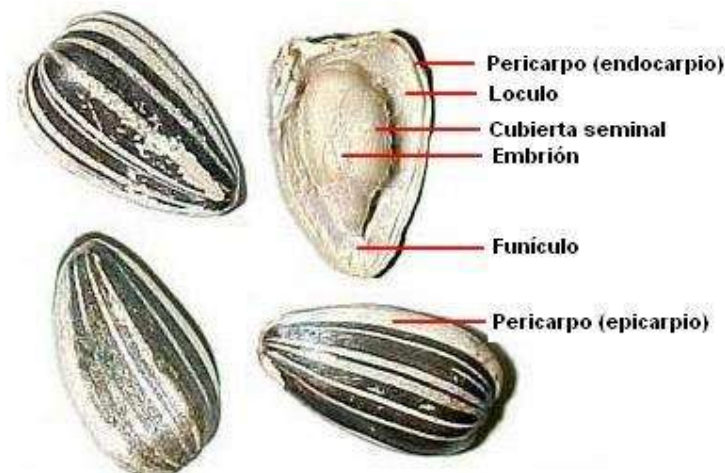


Figura 3. Cipsela de girasol: embrión, cubierta seminal y pericarpo (adaptado de Universidad Politécnica de Valencia, 2003).

Germinación - Dormición

La germinación de la semilla es una de las etapas más importantes en el ciclo de vida de una planta. Un proceso de germinación adecuado determinará un correcto establecimiento de la plántula y un apropiado desarrollo de la planta adulta. Este proceso es muy complejo y comienza con la entrada de agua hacia la semilla e involucra eventos asociados con la transición de un estado de semilla seca y quiescente, a un estado metabólicamente activo (Weitbrecht et al., 2011; Bewley et al., 2013). Las semillas secas contienen una cantidad muy limitada de agua, aunque muchas pueden sobrevivir durante periodos secos de almacenamiento y germinar luego de una subsecuente imbibición. La entrada de agua a la semilla se desarrolla en tres fases: una toma de agua pasiva por parte de las semillas secas (Fase I), una fase de muy poca entrada de agua (Fase II), y una entrada de agua relacionada con el fin de la germinación y el inicio del crecimiento de la plántula (Fase III) (Bewley 1997, Finch-Savage et al., 2006). La transición de la fase II a III marca el fin de la germinación propiamente dicha, la cual no ocurre en semillas muertas o dormidas.

La dormición es una condición mediante la cual una semilla viable y madura no puede germinar debido a mecanismos intrínsecos -de naturaleza física, morfológica y/o fisiológica- aun reuniendo las condiciones necesarias para hacerlo (Koornneef et al., 2002). Desde el punto de vista ecológico, la existencia de dormición es un rasgo adaptativo que evita la viviparidad y previene de este modo la germinación en épocas desfavorables (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Bentsink et al., 2007). En girasol, las semillas pueden presentar dormición inducida por el embrión, por la cubierta seminal y/o pericarpo, o por la combinación de los tres tejidos (Brunick, 2007). Particularmente la dormición impuesta por el embrión comprende un corto período de tiempo, mientras que aquella inducida por la cubierta seminal y/o el pericarpo persiste generalmente por más de 32 semanas. Asimismo, se conoce que existe una gran variabilidad genética respecto al carácter de dormición en las semillas de girasol (Maiti et al., 2006; Brunick, 2007).

Por otro lado, la dormición puede ser un obstáculo para la agricultura debido a que genera una desincronizada emergencia de plántulas a campo, por lo que muchas veces es necesario utilizar tratamientos adecuados para superarla. En girasol así como en numerosas especies, las semillas frescas recién cosechadas pierden la dormición luego de periodos prolongados de almacenamiento en seco (en inglés, “dryafter-ripening”), lo que resulta en una mayor amplitud en las condiciones ambientales que permiten la germinación (Iglesias-Fernandez et al., 2011). La temperatura es un factor ambiental crítico que afecta la dormición durante el almacenamiento en seco. En muchas especies, el grado de dormición se reduce más rápidamente a medida que aumenta la temperatura durante el almacenamiento. En cipselas de girasol se demostró

que durante el almacenamiento en seco la velocidad de pérdida de dormición depende tanto de la temperatura como del contenido de humedad de la semilla (Bazin et al. 2011). Asimismo, está relacionada con cambios en el contenido y/o sensibilidad hormonal de la semilla (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que el almacenamiento en seco por 33 días fue efectivo en eliminar la dormición de semillas de girasol de la línea B123. Además se observó que este tratamiento modifica el perfil hormonal del pericarpo en cipselas de las líneas B123 (con dormición a cosecha) y B91 (sin dormición a cosecha), hecho relacionado con los niveles de dormición diferenciales observados entre ambas líneas (Andrade et al., 2015).

Fitohormonas y procesos de germinación - dormición

Las fitohormonas son un grupo de compuestos químicos que se producen a bajas concentraciones en plantas, y son capaces de regular su crecimiento, desarrollo y capacidad de respuesta a estímulos externos (Davies, 2010). En particular, diversos estudios han demostrado que tanto la germinación y dormición de semillas están regulados sinérgica o antagónicamente por fitohormonas, entre ellas el ácido abscísico (ABA), un inhibidor de la germinación y las giberelinas (GAs), que promueven la germinación. Además, otras fitohormonas están involucradas en la regulación de dichos procesos entre ellas, etileno, citocininas, ácido indol-3-acético, ácido salicílico, jasmonatos, brasinoesteroides y estrigolactonas (Linkies y Leubener-Metzger, 2012; Arc et al., 2013; Skubacz y Daszkowska-Golec, 2017).

Particularmente, el balance ABA-GAs juega un rol muy importante en la germinación/dormición de la semilla (Yamaguchi et al., 2008). Esta relación se observa claramente en el modelo planteado por Piskurewicz et al. (2008), donde se propone un feedback positivo entre ABA y RGL2, gen que codifica una proteína DELLA. Estas proteínas son reguladores negativos en la vía de señalización de las GAs, por lo que actúan como represores de la germinación. Estudios previos en embriones de las líneas de girasol B123 y B91 reportaron diferencias en los niveles hormonales endógenos de ABA y GAs (GA₁ y GA₃) y en la expresión de genes relacionados con su metabolismo y vías de señalización. En este sentido, la expresión del gen RGL2 y la biosíntesis *de novo* de ABA en embriones embebidos de la línea B123 podrían estar involucrados en el mantenimiento de la dormición de esta línea (Roselló et al., 2016). Sin embargo, se requieren más estudios para contribuir a dilucidar el rol de otras hormonas en la regulación de la germinación/dormición.

Jasmonatos: biosíntesis y funciones fisiológicas

Los Jasmonatos (JAs) conforman un grupo de numerosos compuestos precursores o derivados del ácido jasmónico (JA) que ocurren naturalmente en el Reino Plantae y por ser derivados de ácidos grasos poliinsaturados forman parte del grupo de oxilipinas (Blée, 2002; Howe, 2004). JA es una ciclopentanona que posee una cadena pentenilo y una cadena carboxílica. Entre los cuatro isómeros posibles, el enantiómero (-)-JA tiene la configuración absoluta (3*R*, 7*R*), la forma (+)-7-*iso*-JA (3*R*, 7*S*) es fisiológicamente activa (Fig. 4).

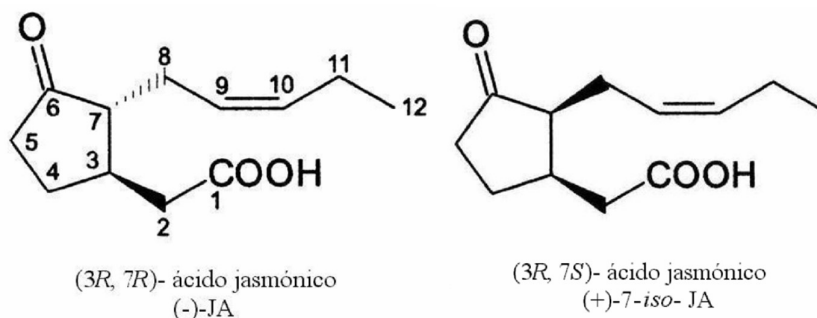


Figura 4. Estructura química del Ácido Jasmónico (Wasternack y Parthier, 1997).

JA se origina a partir del ácido graso poliinsaturado alfa-ácido linolénico (LA), 18:3. Una posible fuente de LA involucra la desaturación de los ácidos grasos poliinsaturados produciendo LA a partir del 18:2 (ácido linoleico) (León y Sánchez-Serrano, 1999). En plantas, especialmente las membranas cloroplásticas constituyen una fuente muy rica de LA esterificado en glicerolípidos y fosfolípidos. La liberación de LA puede ocurrir por acción de acilhidrolasas o fosfolipasas. Actualmente se postula que la fosfolipasa A (PLA) participa en la reacción inicial para la liberación de LA de la vía lipoxigenasa (LOX).

La fuente de ácidos grasos para la biosíntesis de JAs proviene de dos vías: una hexadecanoica (16:3) a partir del galactolípidio monogalactosil diacilglicerol (MGDG) que conduce a la formación de dinor-OPDA (dnOPDA) (Weber et al., 1997; Stelmachet al., 2001), y otra octadecanoica (18:3) a partir del fosfolípido fosfatidilcolina, el cual es sustrato de la lipasa DAD1 (fosfolipasa A₁) (Ishiguro et al., 2001).

La enzima LOX cataliza la inserción de oxígeno en el átomo de C-9 (9-LOX) ó C-13 (13-LOX) de LA, resultando 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 13-HPOT, el cual es convertido por la acción de una óxido de alenosintasa (AOS) a un óxido de aleno altamente inestable (ácido 12, 13-epoxi-octadecatrienoico), el cual en presencia de una óxido de alenociclaza (AOC)

origina ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), primer compuesto cíclico producido. Posteriormente este compuesto es reducido en peroxisoma por OPRs al ácido 3-oxo-pentenilo-ciclopentano-octanoico (OPC- 8:0), el cual luego de tres ciclos de beta-oxidación origina (+)-7-iso-ácido jasmónico. Este isómero se convierte en (-)-JA que es termodinámicamente estable y la forma predominante en los tejidos vegetales. JA posteriormente es metabolizado en citoplasma dando origen a diferentes metabolitos (Wasternack y Hause, 2002). La molécula sufre diversas transformaciones, como hidroxilaciones en C-11 o C-12 y la subsiguiente O-glicosilación (Sembdner y Parthier, 1993) o sulfonación (Gidda et al., 2003); como así también conjugaciones con aminoácidos, principalmente con isoleucina (JA-Ile), leucina (JA-Leu), fenilalanina (JA-Phe) y valina (JA-Val). También se encontraron conjugados con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), molécula precursora del etileno (Staswick y Tiryaki, 2004). Asimismo se generan compuestos volátiles a partir de JA, por metilación mediante metiltransferasas específicas dando lugar a la formación de ME-JA(Seo et al., 2001) y por decarboxilación formando cis-jasmone, una forma inactiva de JA (Koch et al., 1997) (Fig.5).

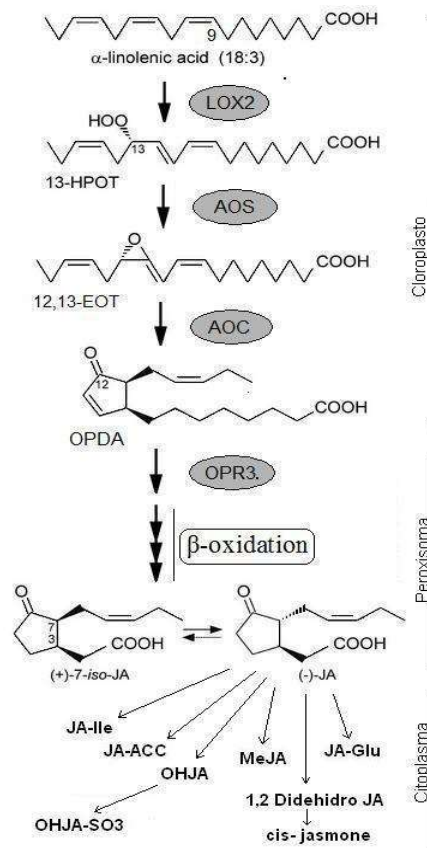


Figura 5. Biosíntesis y metabolismo de JAs (adaptado de Delker et al., 2006).

En cuanto a la función de JAs, estos actúan como moléculas señal en la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés biótico y abiótico, modulan diversos procesos del desarrollo y algunas relaciones simbióticas. Entre las respuestas a estrés, se pueden mencionar aquellas generadas por heridas mecánicas o por herbivoría, sequía, ataque por patógenos entre otras. Durante el crecimiento y desarrollo, JAs participan en diferentes procesos entre los que se pueden mencionar el crecimiento de la raíz, la tuberización, la maduración de frutos, senescencia, desarrollo del polen y enrollamiento de zarcillos (Wasternack y Hause, 2013).

Entre los JAs, las mayores evidencias de compuestos con actividad biológica se encuentran para: 1. JA y MeJA moléculas altamente móviles, que modulan la expresión de genes en relación a diversos procesos del crecimiento, desarrollo y respuestas a estrés (Wasternack y Hause, 2013); 2. JA-Ile el cual parece jugar un rol en la señalización de JAs en hojas y flores de *Arabidopsis* (Fonseca et al., 2009); 3. JA-Triptófano (JA-Trp), inhibidor en la señalización de auxinas en raíces de *Arabidopsis* (Staswick et al., 2009); 4. OPDA, involucrado en las respuestas a estrés biótico y abiótico (Park et al., 2013; Savchenko y Dehesh, 2014), como así también en el desarrollo del embrión y germinación de la semilla (Goetz et al., 2012; Dave et al., 2016). Es conocido que varios procesos fisiológicos son estimulados por actividades conjuntas de OPDA y JA, aunque se han identificado respuestas en las cuales OPDA actúa independientemente de JA (Wasternack y Hause, 2013).

Rol de JAs en la germinación y dormición de semillas

Respecto a la función de JAs en la regulación de la germinación y dormición se han reportado resultados contradictorios. Así, se demostró que JA puede inhibir la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum*, *Brassica napus*, *Lupinus luteus* y *Zea mays* (Miersch et al., 2008; Oh et al. 2009; Zalewski et al., 2010). Por el contrario, es capaz de estimular la germinación en semillas dormidas de *Acer tataricum* (Berestetzky et al., 1991) y *Malus domestica* (Yildiz et al., 2007). Por otro lado, en *Arabidopsis thaliana* el contenido de JA y su derivado conjugado con isoleucina (JA-Ile) fue notablemente diferente en semillas secas y embebidas de los ecotipos Col (no dormido) y Cvi (dormido) (Preston et al., 2009). Más aún, estudios recientes reportaron que la dormición de semillas de trigo es eliminada durante el almacenamiento en seco, lo cual está asociado con la modulación del contenido de JAs en las semillas (Liu et al., 2013). En adición, Dave y Graham (2016) propusieron a cis-OPDA como nuevo “actor” en el control de la germinación. Análisis de semillas en desarrollo revelaron que algunos JAs se acumulan durante la maduración tardía de la semilla, y el análisis de los dobles mutantes *cts-2opr3-1* y *pxal-1 aos* mostró que cis-OPDA, más que JA o jasmonil-L-isoleucina, contribuye a bloquear la germinación de *Arabidopsis thaliana*. Otros

estudios reportaron que cis-OPDA posee efecto sinérgico con ABA en la inhibición de la germinación, promoviendo la biosíntesis de esta hormona mediante la expresión de los genes ABA1 y RGL2, al tiempo que aumenta la sensibilidad de los tejidos a ABA mediante el incremento en la expresión del gen y la estabilidad de la proteína ABI5 (Dave et al., 2016).

HIPÓTESIS

Los jasmonatos (JAs) desempeñan un rol clave en la regulación del proceso de germinación y/o dormición de cipselas de girasol.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación del ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) y ácido jasmónico (JA) en la germinación y/o dormición de cipselas de girasol de dos líneas endocriadas contrastantes en su capacidad germinativa, y analizar la interacción entre ambas fitohormonas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles endógenos de OPDA y JA en eje embrionario y cotiledones de semillas secas de las líneas B91 y B123 al momento de cosecha (0 días).
2. Cuantificar los niveles endógenos de OPDA y JA en eje embrionario y cotiledones de semillas secas de las línea B123 luego de su almacenamiento en seco (33 días post-cosecha, 25°C±1).
3. Cuantificar los niveles endógenos de OPDA y JA en eje embrionario y cotiledones de semillas de las líneas B91 y B123 durante el proceso de imbibición en las condiciones anteriormente mencionadas.
4. Correlacionar la capacidad germinativa de las semillas de ambas líneas con los niveles hormonales endógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de almacenamiento

Semillas de girasol de las líneas B123 (con dormición a cosecha) y B91 (sin dormición a cosecha) provistas por el MSc. Daniel Álvarez de EEA INTA-Manfredi se utilizaron para la realización de los ensayos programados. Inmediatamente luego de la cosecha a campo, parte de las semillas de la línea B123 fueron almacenadas a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C}\pm 1$) por el término de 33 días. Se trabajó con semillas de: 0 días (líneas B123 y B91) y 33 días post-cosecha a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ (línea B123).

Obtención de eje embrionario y cotiledones para las determinaciones hormonales

Eje embrionario y cotiledones fueron obtenidos de semillas secas y embebidas a 0 días (líneas B123 y B91) y 33 días post-cosecha a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ (línea B123).

I- Semillas Secas: El embrión de veinticinco semillas (por repetición) de las líneas B123 y B91 fue separado de la semilla y seccionados cuidadosamente en eje embrionario y cotiledones. Posteriormente ambas partes se congelaron en N_2 líquido, liofilizaron y conservaron a -20°C hasta su uso. Las experiencias se realizaron por triplicado.

II- Semillas embebidas: Veinticinco semillas (por repetición) de las líneas B123 y B91 se sembraron en bandejas de plástico entre toallas de papel húmedo y se colocaron a germinar en condiciones ambientales generadas por Cuartos Ambientales Conviron PR48 programados con 8 h de oscuridad a 18°C y 90% de HR y 16 h de luz ($130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) a 28°C y 80% de HR. A las 3, 6, 12 y 18 h de imbibición se recolectaron las semillas y se separó el embrión del pericarpo, el cual fue seccionado en eje embrionario y cotiledones. Posteriormente se congelaron en N_2 líquido, liofilizaron y conservaron a -20°C hasta su uso. Las experiencias se realizaron por triplicado.

Extracción, identificación y cuantificación de JAs

Los niveles endógenos de OPDA y JA fueron evaluados en semillas (eje embrionario y cotiledones) B123 y B91 a diferentes tiempos de imbibición (0, 3, 6, 12 y 18 h). La extracción y purificación de OPDA y JA se llevó a cabo según protocolo modificado de Durgbanshi et al. (2005). 200 mg de peso seco de material vegetal se homogeneizó con N_2 líquido y 5 ml de agua deionizada como solvente de extracción. Como estándar interno se agregaron 200 ng de ($^2\text{H}_5$)-OPDA y 50 ng de ($^2\text{H}_6$)-JA. Cada muestra se pasó por ultraturrax durante 30 seg para completar la homogeneización y

equilibración de estándares. Luego las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min. Se recogió el sobrenadante ajustándose el pH a 2,8 con ácido acético 15%. Posteriormente se realizaron dos particiones con éter etílico, recolectándose las fases orgánicas las que se llevaron a sequedad. Los extractos secos se resuspendieron en 1 ml de metanol, se filtraron a través de un filtro de jeringa (velocidad de flujo menor a 1ml/min.), y finalmente se secaron bajo vacío en SpeedVac.

Los extractos secos de las muestras conteniendo OPDA y JA se resuspendieron con 50 μ l 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 μ m) a 25°C, con un volumen de inyección de 10 μ l. 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 μ l 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 OPDA y JA 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 (Monitoreo de Reacciones Múltiples). La adquisición de datos por MRM se realizó por monitoreo de iones parentales y transiciones para OPDA, JA y ²D₅-OPDA y ²D₆-JA (estándares internos) respectivamente.

Reproducibilidad de las determinaciones y análisis estadístico

Las experiencias se realizaron utilizando un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) con 3 repeticiones temporales. Las determinaciones hormonales se efectuaron a partir de cuatro extracciones independientes. Las diferencias significativas entre medias de las variables evaluadas en cipselas de las líneas B123 y B91 se realizaron mediante Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA), utilizando a posteriori un test de Rangos Múltiples (LSD de Fisher) ($p \leq 0.05$). El software empleado fue InfoStat (Di Rienzo et al., 2014, InfoStat/Profesional ver. 2012, Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC).

RESULTADOS

OPDA y JA se cuantificaron en eje embrionario y cotiledones de semillas secas y embebidas de la línea B91a los 0 días post-cosecha. En la línea B123 ambos compuestos se cuantificaron a los 0 días post-cosecha y luego del almacenamiento en seco de las semillas por 33 días a temperatura ambiente (25°C).

Los niveles endógenos de OPDA y JA presentaron diferencias entre ambas líneas y los mismos fueron modificados durante la imbibición (Figs. 6 a 11). Asimismo, en la línea B123 se observaron diferencias en los niveles endógenos según las condiciones de almacenamiento (Figs. 8 a 11).

Niveles endógenos de OPDA y JA en embriones de semillas de la línea B91

A los 0 días post-cosecha, los niveles endógenos de OPDA y JA fueron superiores en eje embrionario respecto a cotiledones (Figs. 6 y 7). En eje embrionario OPDA se mantuvo estable hasta las 6 h de imbibición y luego disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) a las 12 y 18 h (Fig. 6A). JA aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) (aprox. 3 veces) a las 6 h y posteriormente disminuyó hasta el final del experimento (Fig. 6B).

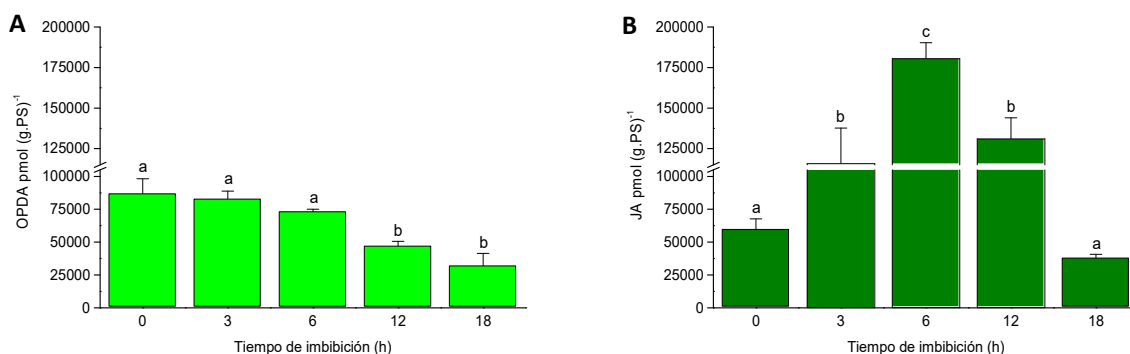


Fig. 6. Niveles endógenos de OPDA (A) y JA (B) (pmol.g PS^{-1}) en eje embrionario de semillas de la línea B91a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha ($n=3 \pm \text{ES}$). Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

En cotiledones, OPDA se mantuvo relativamente constante durante el transcurso de la imbibición (Fig. 7A). Por otro lado, el contenido de JA disminuyó gradualmente hasta las 6 h de imbibición y luego aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) (7 veces) a las 18 h (Fig. 7B).

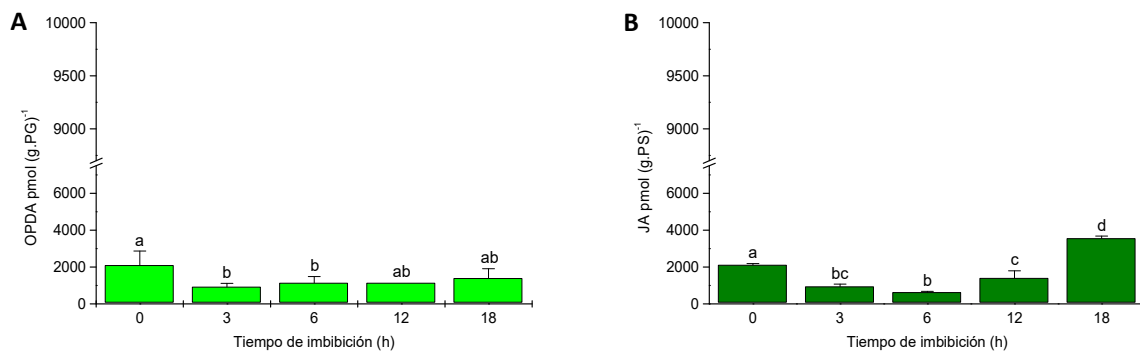


Fig. 7. Niveles endógenos de OPDA (A) y JA (B) (pmol.g PS⁻¹) en cotiledones de semillas de la línea B91 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha (n=3 ± ES). Letras diferentes indican diferencias significativas a p < 0,05.

Niveles endógenos de OPDA y JA en embriones de semillas de la línea B123

Al momento de cosecha, los niveles endógenos de OPDA y JA en eje embrionario de la línea B123 fueron menores respecto a los de la línea B91 (Figs. 6 y 8). Ambas hormonas presentaron niveles estables durante la imbibición (Fig. 7).

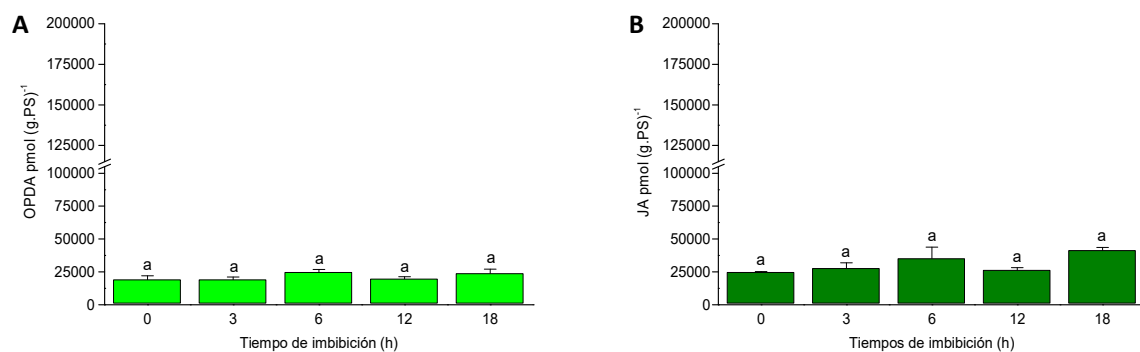


Fig. 8. Niveles endógenos de OPDA (A) y JA (B) (pmol.g PS⁻¹) en eje embrionario de semillas de la línea B123 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha (n=3 ± ES). Letras diferentes indican diferencias significativas a p < 0,05.

En cotiledones, los niveles de OPDA fluctuaron a lo largo del experimento, detectándose picos de acumulación a las 0 y 12 h de imbibición (Fig. 9A). Respecto a JA, se cuantificaron niveles relativamente bajos y estables durante todo el experimento (Fig. 9B).

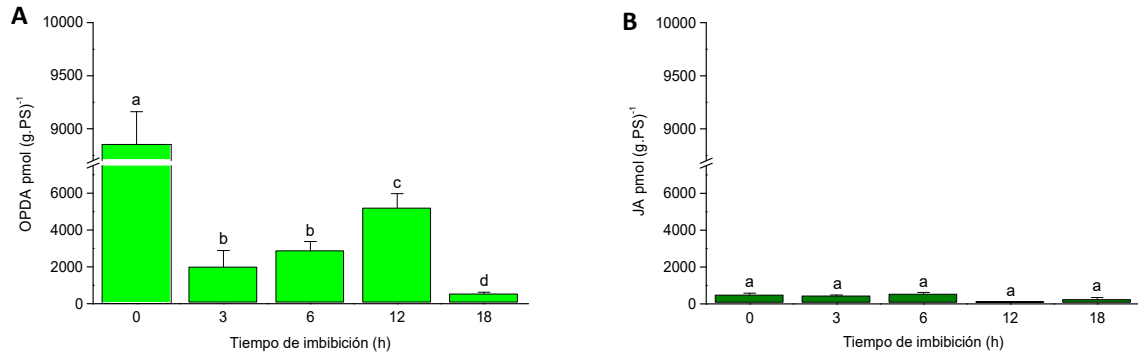


Fig. 9. Niveles endógenos de OPDA (A) y JA (B) (pmol.g PS⁻¹) en cotiledones de semillas de la línea B123 a diferentes tiempos de imbibición a los 0 días post-cosecha (n=3 ± ES). Letras diferentes indican diferencias significativas a p <0,05.

A los 33 días post-cosecha, un incremento en los niveles de OPDA y JA se registraron en eje embrionario de semillas secas y embebidas respecto a los 0 días post-cosecha (Figs. 8 y 10). Durante la imbibición, OPDA incrementó significativamente (p ≤ 0.05) (Fig. 10A) mientras que los niveles de JA se mantuvieron altos pero constantes (Fig. 10B).

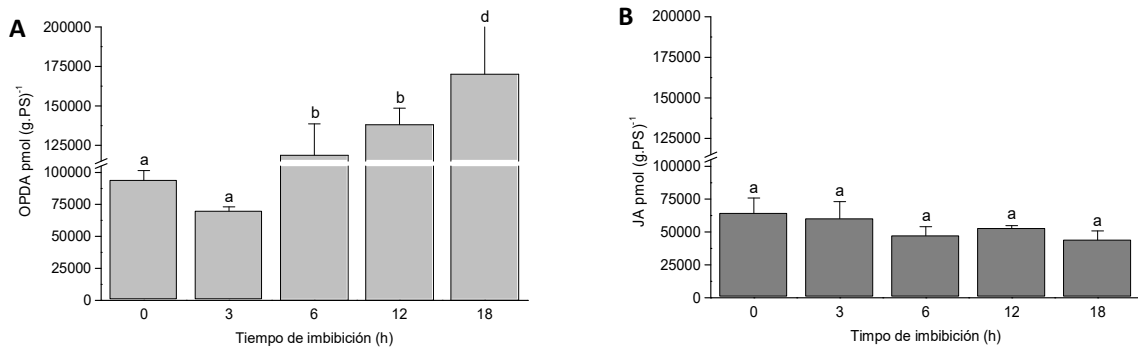


Fig. 10. Niveles endógenos de OPDA (A) y JA (B) (pmol.g PS⁻¹) en eje embrionario de semillas de la línea B123 a diferentes tiempos de imbibición luego del almacenamiento en seco por 33 días post-cosecha a 25°C±1°C (n=3 ± ES). Letras diferentes indican diferencias significativas a p <0,05.

En esta condición, los cotiledones de semillas secas de la línea B123 registraron los mayores niveles de OPDA, los cuales posteriormente decrecieron, manteniéndose relativamente constantes a lo largo de la imbibición (Fig. 11A). En cuanto a JA, su nivel aumentó aproximadamente 2,5 veces a las 12 y 18 h de imbibición (Fig. 11B).

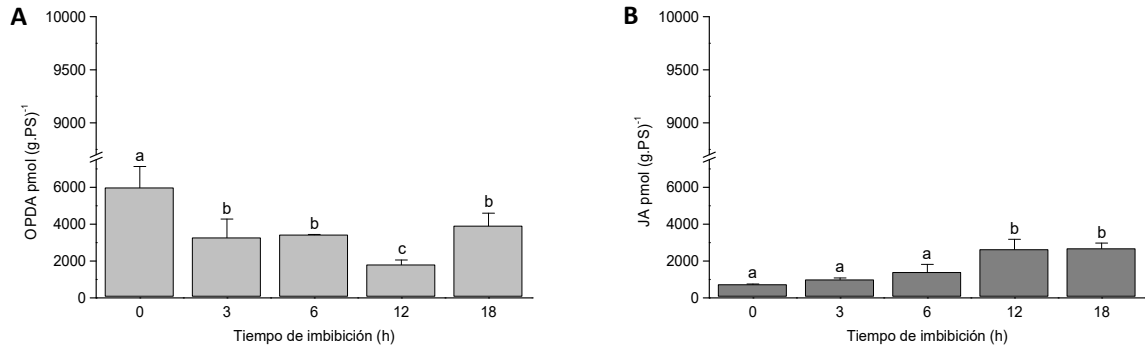


Fig. 11. Niveles endógenos de OPDA (A) y JA (B) (pmol.g PS⁻¹) en cotiledones de semillas de la línea B123 a diferentes tiempos de imbibición luego del almacenamiento en seco por 33 días post-cosecha a 25°C±1°C (n=3 ± ES). Letras diferentes indican diferencias significativas a p <0,05.

DISCUSIÓN

Las plantas con semillas han evolucionado a fin de mantener la dormición de las mismas hasta que las condiciones ambientales sean apropiadas para su germinación. De este modo la transición entre dormición y germinación no sólo es un paso crítico en el ciclo de vida de las plantas sino que también es importante para la producción agrícola. De hecho, la dormición de semillas es un rasgo no deseado para los cultivos que requieren una germinación rápida y uniforme después de la siembra. En nuestro país, lograr un alto rendimiento del cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.) es una de las metas actuales y a futuro de los productores agrícolas, lo que implica obtener una adecuada implantación y establecimiento de plántulas. Sin embargo, para este cultivo han sido reportados problemas de dormición ocasionados por los distintos tejidos que componen su semilla (Brunick, 2007).

Particularmente, estudios previos de nuestro grupo determinaron que las características anatómicas y fisiológicas del pericarpo estarían relacionadas con los diferentes grados de dormición observados en las líneas de girasol B123 (con dormición a cosecha) y B91 (sin dormición a cosecha) (Andrade et al., 2015). Asimismo, diferencias en el metabolismo y camino de señalización de ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GAs) fueron detectadas en embrión de dichas líneas (Roselló et al., 2016). No obstante, estudios adicionales son necesarios para dilucidar la contribución de los diferentes tejidos que constituyen la semilla en la regulación hormonal de la germinación y dormición de semillas de girasol. De hecho, recientemente diversas investigaciones han comenzado a abordar las funciones particulares de los diferentes tejidos de la semilla en el control de la dormición (Graeber et al., 2012).

Es altamente conocida la participación de ABA y GAs en la germinación y/o dormición de semillas; sin embargo, ambos procesos son controlados por la interacción entre diversas fitohormonas, entre ellas los JAs (Linkies y Leubner-Metzger 2012; Shu et al., 2016). Diferentes trabajos reportaron que JA y su precursor OPDA desempeñan un importante rol en la dormición y/o germinación (Preston et al., 2009; Daveet al., 2011; 2016), y el mismo varía según la especie analizada ya que resultados contradictorios han sido informados, con algunos efectos inhibidores (Miersch et al., 2008; Oh et al., 2009; Zalewski et al., 2010) y otros promotores de la germinación (Yildiz et al., 2007).

En embrión (eje embrionario + cotiledones) de semillas secas de la línea dormida B123, los niveles de JA + OPDA fueron menores comparados con los de la línea no dormida B91, por lo tanto, estos compuestos no estarían directamente involucrados en la imposición de la dormición atribuida al embrión en semillas de girasol. En concordancia Preston et al. (2009) detectaron altos niveles de JA y JA-Ile en semillas de *Arabidopsis* del cultivar Col dormido.

Por otro lado, eje embrionario y cotiledones de ambas líneas presentaron diferentes perfiles en los niveles endógenos de OPDA y JA. En este sentido, ha sido demostrado que diferentes partes de las semillas presentan diferencias en sus perfiles hormonales endógenos. Así, diferentes niveles endógenos de ABA, GAs y citocininas fueron cuantificados en diferentes estructuras de la región micropilar de semillas secas dormidas y semillas embebidas no germinadas y germinadas de palma guacamayo (*Acrocomia aculeata*) (Ribeiro et al., 2015). En nuestras condiciones experimentales, los ejes embrionarios de ambas líneas registraron los mayores niveles de OPDA y JA, seguidos por el pericarpo (Andrade et al., 2015) y los cotiledones. Estos resultados indicarían que OPDA y JA podrían desempeñar un importante rol tejido-específico en el control de la germinación de semillas de girasol. De hecho

A los 0 días post-cosecha, OPDA y JA se acumularon preferentemente en eje embrionario de semillas secas de la línea no dormida B91 lo cual podría estar asociado con eventos posteriores que ocurren durante la germinación de sus semillas. Una tendencia similar se observó en eje embrionario de semillas secas de la línea B123 a los 33 días post-cosecha, momento en el cual estas semillas perdieron dormición. En base a dicha observación y comparando los niveles endógenos de OPDA y JA, se podría establecer un nivel umbral (OPDA: $75000 \text{ pmol (g.PS)}^{-1}$; JA: $50000 \text{ pmol (g.PS)}^{-1}$) para cada compuesto, a partir del cual se desencadenaría la germinación de las semillas. De hecho, aplicaciones exógenas de JA estimulan la elongación del eje embrionario y la movilización de sustancias de reserva en *Malus domestica* Borb. (Bogatek et al., 2002).

Por otra parte, durante la imbibición temprana de semillas de la línea B91, el importante incremento en los niveles de JA en eje embrionario fue correlacionado con una disminución de OPDA en el mismo tejido y de JA en cotiledones. Esto nos permite sugerir que en eje embrionario JA puede ser sintetizado “*de novo*” y/o puede ser liberado a partir de formas conjugadas tales como JA-Ile, Me-JA, JA- glucosilester, entre otras (Wasternack y Song, 2016). Asimismo, no debería descartarse la posibilidad de que pueda ser transportado desde los cotiledones hacia el eje embrionario. De hecho, recientemente se identificaron proteínas implicadas en el transporte de OPDA, JA y JA-Ile en plántulas de *Arabidopsis* (Nguyen et al., 2017).

Por otro lado, la significativa acumulación de OPDA en cotiledones de la línea B123 a los 0 días post-cosecha podría indicar que dicha hormona funcionaría como un pool para la posterior síntesis de JA cuando las semillas pierdan dormición y sean capaces de germinar. De hecho, luego del almacenamiento en seco cuando las semillas de la línea B123 pierden dormición (Andrade et al., 2015), un incremento importante en los niveles de JA se registra en eje embrionario en todos los tiempos de imbibición analizados. En este sentido, un aumento en la concentración de JA se asoció con el desarrollo del eje vegetativo en semillas de palma guacamaya (Ribeiro et al., 2015).

Si bien diferentes trabajos muestran que el rol de JAs en la germinación y/o dormición de semillas es contradictorio, Jacobsen et al. (2013) demostraron que estos compuestos actúan antagónicamente con ABA en la promoción de la liberación de la dormición de semillas de trigo. Asimismo, Xu et al. (2016), observaron que la síntesis de JA aumenta en embriones de trigo luego de la estratificación con frío y dicho aumento se correlaciona con el efecto promotor sobre la germinación. Particularmente, la liberación de la dormición de semillas de trigo luego del almacenamiento en seco está asociada al contenido de JAs, específicamente a los niveles de JA-Ile (Liu et al., 2013).

En conclusión, OPDA y JA estarían involucrados en la germinación y liberación de la dormición impuesta por el embrión en semillas de girasol. Teniendo en cuenta nuestros resultados, la germinación de semillas de girasol se desencadenaría cuando los niveles de OPDA y JA son altos en eje embrionario y bajos en cotiledones. En contraste, las semillas de girasol serían incapaces de germinar, si no alcanzan determinados umbrales en la concentraciones de OPDA y JA en eje embrionario (Fig. 12). No obstante, estudios adicionales son necesarios a fin de dilucidar la participación de otros JAs con actividad hormonal, tales como JA-Ile y OPDA-Ile, en la regulación de dichos procesos, como así también la expresión de genes de biosíntesis, catabolismo y/o camino de señalización de estos compuestos en los diferentes tejidos que constituyen la semilla.

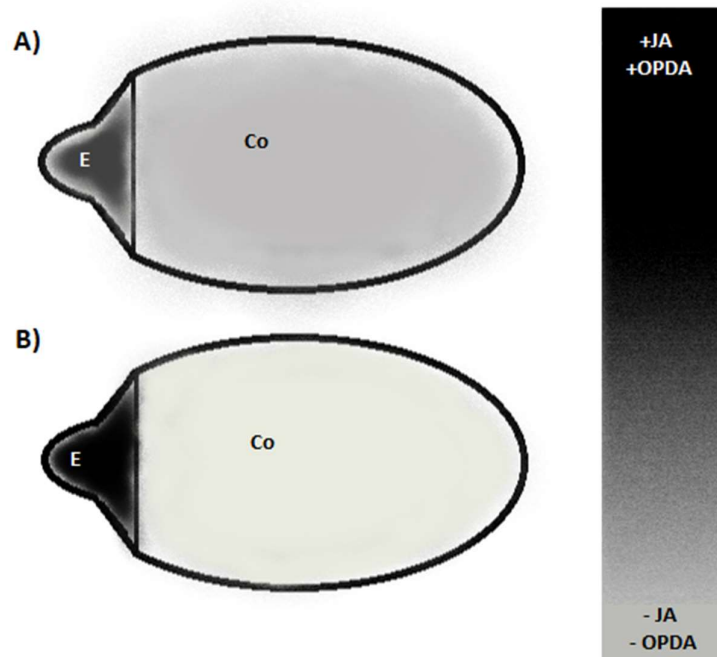


Fig. 12. Representación esquemática de los niveles endógenos de OPDA y JA en eje embrionario y cotiledones de la semilla seca. A) Dormida. B) No dormida. E: Eje embrionario, Co: Cotiledones.

CONCLUSIONES

- La germinación de semillas de girasol se desencadenaría cuando los niveles de OPDA y JA son altos en eje embrionario y bajos en cotiledones.
- La germinación de las semillas de girasol podría desencadenarse a partir de niveles umbrales de OPDA y JA en eje embrionario ($75000 \text{ pmol (g.PS)}^{-1}$ y $50000 \text{ pmol (g.PS)}^{-1}$ respectivamente).
- Los niveles endógenos de OPDA y JA en semillas secas indicarían que estos compuestos no actúan como mediadores primarios en la imposición de la dormición de la línea B123 mediada por el embrión.
- El perfil hormonal de eje embrionario y cotiledones fue diferencialmente modificado por el proceso de imbibición y el almacenamiento en seco a temperatura ambiente.
- JA y su precursor OPDA estarían involucrados en la liberación de la dormición de la línea B123 mediada por el embrión; por lo tanto, se demostró la participación de ambos compuestos en la germinación de semillas de girasol.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade A., Riera N., Lindstrom L., Alemano S., Alvarez D., Abdala G., Vigliocco A. 2015. Pericarp anatomy and hormone profiles of cypselas in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. *Plant Biol.* 17: 351-360.
- Andreani P. 2004. Soja. La industria en la argentina: En: Producción agroindustrial del NOA. Website: http://www.produccion.com.ar/2004/04dic_05.htm. Consultado: 07/06/2017.
- Arc E., Sechet J., Corbineau F., Rajjou L., Marion-Poll A. 2013. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Plant Sci.* 4: 1-19.
- ASAGIR. 2017. El girasol. Importancia económica. En: <http://www.asagir.org.ar/acerca-de-importancia-economica-460>. Consultado: 18/10/2017.
- Bazin J., Batlla D., Dussert S., El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. 2011. Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *J. Exp. Bot* 62: 627-640.
- Bentsink L., Soppe W., Koornneef M. 2007. Genetic aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 27: 113-132.
- Berestetzky V., Dathe W., Daletskaya T., Musatenko L., Sembdner G. 1991. Jasmonic acid in seed dormancy of *Acer tataricum*. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 187: 13-19.
- Bewley J.D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell.* 9: 1055-1066.
- Bewley J.D., Bradford K.J., Hilhorst H.W., Nonogaki H. 2013. Longevity, storage, and deterioration. *Seeds*: 341-376.
- Blée E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7: 315-322.
- Bogatek R., Côme D., Corbineau F., Ranjan R., Lewak S. 2002. Jasmonic acid affects dormancy and sugar catabolism in germinating apple embryos. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 167-173.
- Brunick R. 2007. Seed dormancy in domesticated and wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.): types, longevity and QTL discovery. Oregon State University Department of Horticulture, Doctoral Dissertation.
- Dave A., Vaistij F.E., Gilday A.D., Penfield S.D., Graham I.A. 2016. Regulation of *Arabidopsis thaliana* seed dormancy and germination by 12-oxo-phytodienoic acid. *J. Exp. Bot.* 67: 2277-2284.
- Davies P.J. 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. *Plant hormones*: 1-15.
- Delker C., Stenzel I., Hause B., Miersch O., Feussner I., Wasternack C. 2006. Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - enzymes, products, regulation. *Plant Biol.* 8: 297-306.

- Durgbanshi A., Arbona V., Pozo O., Miersch O., Sancho J.V., Gómez-Cadenas A. 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 53: 8437-8442.
- Escande A. 2011. Documento Base del Programa Nacional Oleaginosas. En: INTA. <https://inta.gov.ar/documentos/documento-base-del-programa-nacional-oleaginosas>. Consultado: 12/04/2017.
- Feussner I., Wasternack C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 275-297.
- Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.
- Fonseca S., Chini A., Hamberg M., Adie B., Porzel A., Kramell R., Miersch O., Wasternack C., Solano R. 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* 58: 344-350.
- Gidda S.K., Miersch O., Levitin A., Schmidt J., Wasternack C., Varin L. 2003. Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 17895-17900.
- Goetz S., Hellwege A., Stenzel I., Kutter C., Hauptmann V., Forner S., McCaig B., Hause G., Miersch O., Wasternack C., Hause B. 2012. Role of cis-12-oxo-phytodienoic acid in tomato embryo development. *Plant Physiol.* 158: 1715-1727.
- Graeber K., Nakabayashi K., Miatton E., Leubner-Metzger G., Soppe WJ. 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environ.* 35: 1769-1786.
- Howe G.A. 2004. The roles of hormones in defense against insects and disease. En: Davies P.J. (ed). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Cornell University, NY, USA, pp: 610-634.
- Iglesias-Fernández R., Rodríguez-Gacio M., Matilla A.J. 2011. Progress in research on dry after-ripening. *Seed Sci. Res.* 21: 69-80.
- Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K. 2001. The DEFECTIVE IN ANTHHER 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.
- Jacobsen J.V., Barrero J.M., Hughes T., Julkowska M., Taylor J.M., Xu Q., Gubler F. 2013. Roles for blue light, jasmonate and nitric oxide in the regulation of dormancy and germination in wheat grain (*Triticum aestivum* L.). *Planta.* 238: 121-138.
- Koch T., Bandemer K., Boland W. 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.
- Koornneef M., Bentsink L., Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36.

- León J., Sánchez-Serrano J.J. 1999. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 373-380.
- Linkies A., Leubner-Metzger G. 2012. Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Rep.* 31: 253-270.
- Liu A., Gao F., Kanno Y., Jordan M.C., Kamiya Y., Seo M., Ayele B.T. 2013. Regulation of wheat seed dormancy by after-ripening is mediated by specific transcriptional switches that induce changes in seed hormone metabolism and signaling. *PLoS ONE.* 8: e56570.
- Maiti R.K., Vidyasagar P., Shahapur S.C., Seiler G.J. 2006. Studies on genotypic variability and seed dormancy in sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.). *Indian J. Crop Sci.* 1: 84-87.
- Maldonado Zarain R. 2003. Establecimiento de una composta comunitaria en San Andrés Cholula y determinación del efecto de sus lixiviados en un cultivo de girasol (*Helianthus annuus*). Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Química y Biología. Tesis profesional de la Licenciatura en Biología con área en Ecología.
- Miersch O., Neumerkel J., Dippe M., Stenzel I., Wasternack C. 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.
- MINAGRI. 2017. Estimaciones agrícolas informe mensual. 2017. En: http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/_archivos/estimaciones/170500_Mayo/170524_Informe%20Mensual%2024%2005%2017.pdf. Consultado: 07/06/2017.
- Nguyen C.T., Martinoia E., Farmer E.E. 2017. Emerging jasmonate transporters. *Mol. Plant.* 10: 659-661.
- Oh E., Kang H., Yamaguchi S., Park J., Lee D., Kamiya Y., Choi G. 2009. Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 21: 403-419.
- Oilseed. 2017. World markets and Trade. Foreign Agricultural Service/USDA. En: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>. Consultado: 13/06/2017.
- Park S.W., Li W., Viehhauser A., He B., Kim S., Nilsson A.K., Esker A.R., Andersson M.X., Kittle J.D., Ambavaram M.M.R., Luan S., Esker A.R., Tholl D., Cimini D., Ellerström M., Coaker G., Mitchell T.K., Pereira A., Dietz K.J., Lawrence C.B. 2013. Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110: 9559-9564.
- Piskurewicz U., Jikumaru Y., Kinoshita N., Nambara E., Kamiya Y., Lopez-Molina L. 2008. The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell.* 20: 2729-2745.

- Preston J., Tatematsu K., Kanno Y., Hobo T., Kimura M., Jikumaru Y., Yano R., Kamiya Y., Nambara E. 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.
- Ribeiro L.M., Garcia Q.S., Müller M., Munné-Bosch S. 2015. Tissue-specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. *Physiol. Plant.* 153: 627-642.
- Roselló P.L., Vigliocco A.E., Andrade A.M., Riera N.V., Calafat M., Molas M.L., Alemano S.G., Differential hormonal and gene expression dynamics in two inbred sunflower lines with contrasting dormancy level. *Plant. Physiol. Biochem.* 102: 133-140.
- Savchenko T., Dehesh K. 2014. Drought stress modulates oxylipin signature by eliciting 12-OPDA as a potent regulator of stomatal aperture. *Plant. Signal. Behav.* 9: 1151-60.
- Sembdner G.A.P.B., Parthier B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 44: 569-589.
- Seo H.S., Song J.T., Cheong J.J., Lee Y.H., Lee Y.W., Hwang I., Lee J.S., Choi Y.D. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 4788-4793.
- Shu K., Liu X.D., Xie Q., He Z.H. 2016. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol. Plant* 9: 34-45.
- Skubacz A., Daszkowska-Golec A. 2017. Seed Dormancy: The complex process regulated by abscisic acid, gibberellins, and other phytohormones that makes seed germination work. En: <https://www.intechopen.com/books/phytohormones-signaling-mechanisms-and-crosstalk-in-plant-development-and-stress-responses>. Consultado: 29/08/2017.
- Staswick P. 2009. Plant hormone conjugation: a signal decision. *Plant Signal Behav.* 4: 757-759.
- Staswick P.E., Tiriyaki I. 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., Muller A., Hennig P., Gebhardt S., Schubert-Zsilavec M., Weiler E.W. 2001. A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyldiglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276: 12832-12838.
- Universidad Politécnica de Valencia, 2003. Botánica. Frutos. Aqueños. En: http://www.euita.upv.es/varios/biologia/web_frutos/aquenio.htm .Consultado: 18/10/2017.
- USDA. 2016. Argentina. Oil seed and Products Annual. 2016/17 Soybean Area Forecast Down as Area for Competing Crops Expands Dramatically; Sunflower Area Expands by 36 percent in 2016/2017. En:

https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Oilseeds%20and%20Products%20Annual_Buenos%20Aires_Argentina_4-4-2016.pdf. Consultado: 07/06/2017.

Wasternack C., Hause B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 72: 165-221.

Wasternack C., Hause B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* 111: 1021-1058.

Wasternack C., Parthier B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2: 302-307.

Wasternack C., Song S. 2016. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J. Exp. Bot.* 68: 1303-1321.

Weber H., Vick B.A., Farmer E.E. 1997. Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10473-10478.

Weitbrecht K., Müller K., Leubner-Metzger G. 2011. First off the mark: early seed germination. *J. Exp. Bot.* 62: 3289-3309.

Xu Q., Truong T.T., Barrero J.M., Jacobsen J.V., Hocart C.H., Gubler F. 2016. A role for jasmonates in the release of dormancy by cold stratification in wheat. *J. Exp. Bot.* 67: 3497-3508.

Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225-51.

Yildiz K., Yazici C., Muradoglu F. 2007. Effect of jasmonic acid on germination dormant and non dormant apple seeds. *Asian J. Chem.* 19: 1098-1102.

Zalewski K., Nitkiewicz B., Lahuta L.B., Głowacka K., Socha A., Amarowicz R. 2010. Effect of jasmonic acid-methyl ester on the composition of carbohydrates and germination of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) seeds. *J. Plant Physiol.* 167: 967-973.

Zuil S., 1974. Ecofisiología de Girasol y Soja INTA Reconquista. En: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-fenologia_girasol.pdf. Consultado: 18/10/2017.