



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTRIGOLACTONAS Y BRASINOESTEROIDES:
SU INTERACCIÓN CON ÁCIDO ABSCÍSICO EN LA
REGULACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y DORMICIÓN
DE SEMILLAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)**

DEL BEL ZOÉ

2019

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 Alemano

Dra. Susana Suárez

Dra. Ana Vigliocco

Fecha de presentación: 19 de marzo de 2019

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	3
- El cultivo de girasol en Argentina.....	3
- Descripción del material vegetal.....	4
- Germinación y dormición en cipselas de girasol.....	5
- Fitohormonas en la regulación de la germinación y dormición	6
- Ácido Abscísico.....	7
- Estrigolactonas.....	9
- Brasinoesteroides.....	10
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
- Material vegetal.....	15
- Determinación de poder germinativo.....	15
- Obtención de eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo para la determinación de niveles hormonales endógenos.....	15
- Tratamientos exógenos con reguladores del crecimiento y determinación de niveles hormonales endógenos.....	15
- Extracción, purificación, identificación y cuantificación de niveles hormonales endógenos.....	17
Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS	19
- Determinación de poder germinativo.....	19
- Determinación de poder germinativo luego de la aplicación exógena de reguladores del crecimiento.....	19
Determinación de niveles hormonales endógenos en eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo.....	21
Niveles endógenos de Ácido Abscísico.....	21
Niveles endógenos de Deoxiestrigol.....	23

Niveles endógenos de Castasterona.....	25
Efecto de tratamientos exógenos efectivos en la ruptura de la dormición sobre los niveles hormonales endógenos de eje embrionario.....	27
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	37

RESUMEN

En los sistemas productivos la dormición en semillas es una característica no deseada, ya que una germinación rápida y uniforme es requerida después de la siembra. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción de brasinoesteroides (BRs), estrigolactonas (SLs) y ácido absísico (ABA) en la germinación y dormición de semillas de líneas endocriadas de girasol con diferentes niveles de dormición a cosecha. Para esto, se determinó el poder germinativo de semillas de girasol de las líneas Xi3, Xi3dm y X274 antes y luego de la aplicación de tratamientos exógenos con reguladores del crecimiento. El nivel endógeno de ABA, deoxiestrigol y castasterona se determinó en embrión y cubiertas seminales de semillas secas. Por otro lado, estos compuestos fueron cuantificados en eje embrionario de semillas Xi3 tratadas con reguladores de crecimiento efectivos en la ruptura de la dormición durante la imbibición temprana. Las hormonas se extrajeron por una doble partición con éter etílico, y se identificaron y cuantificaron mediante Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas en Tándem (LC-ESI/MS-MS). Las líneas con dormición a cosecha (Xi3 y Xi3dm) presentaron mayores niveles endógenos de ABA en embrión, mientras que en la línea X274, sin dormición, los niveles de ABA fueron superiores en las cubiertas seminales. En cuanto a deoxiestrigol los mayores niveles endógenos se registraron en la testa, mientras que el pericarpo presentó los menores niveles en todas las líneas analizadas. Para castasterona no se observó ningún patrón hormonal claramente definido en los diferentes tejidos de las tres líneas. Los tratamientos más efectivos en la ruptura de la dormición de semillas de girasol fueron GA₃ y Ethephon, solos o combinados. La aplicación de tratamientos exógenos de reguladores del crecimiento efectivos en la ruptura de la dormición en girasol modificó los niveles endógenos de ABA, BRs y SLs en eje embrionario. En lo que respecta a ABA, durante la imbibición todos los tratamientos redujeron de manera significativa el nivel endógeno de esta fitohormona respecto a las 0 h. En relación a deoxiestrigol, a las 12 h de imbibición alcanzó niveles endógenos relativamente menores en eje embrionario tratados con GA₃ solo o combinado con Ethephon respecto a la condición control. En cuanto a castasterona, un incremento notable se registró a las 12 h imbibición en eje embrionario de Xi3 luego de los tratamientos exógenos. Estos resultados demuestran que ABA estaría relacionado con la imposición de la dormición impuesta por el embrión y deoxiestrigol estaría implicado en la germinación de semillas de girasol.

ABREVIATURAS

AAO: ABA aldehído oxidasa

ABA: ácido abscísico

AIA: ácido indol-3-acético

BL: brasinolide

BRs: brasinoesteroides

CN: campestanol

CR: campesterol

CS: castasterona

ESI-: Electrospray negativo

GAs: giberelinas

MAX1: citocromo 450 monooxigenasa

MeOH: Metanol

NCED: 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa

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

MRM: Monitoreo de Reacciones Múltiples

SA: ácido salicílico

SDR: dehidrogenasa/reductasa de cadena corta

SIR: Reacción Selectiva de Iones

SLs: estrigolactonas

ZEP: zeaxantinaepoxidasa

6-BAP: 6-bencilaminopurina

INTRODUCCIÓN

El cultivo de girasol en Argentina

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un cultivo nativo de América, más específicamente de la región del centro y norte del continente. Fue introducido en Europa a mediados del siglo XVI y en Argentina a finales del siglo XIX. A partir del siglo XX comenzó a cultivarse de manera masiva en la provincia de Buenos Aires (Añon, 2016), sufriendo una gran expansión entre los años 1930-1950.

En Argentina el cultivo de girasol ocupa una superficie aproximada de 2.000.000 ha con una producción de 3.5×10^6 tn en la campaña 2017-2018. Se cultiva entre los 24° y 38° S, comprendiendo la Región Chaqueña hasta el sudoeste de la Región Pampeana, diferenciándose una región norte, una región centro y una región sur (Fig. 1). La siembra comienza a fines del mes de julio en la región norte, extendiéndose hasta mediados del mes de diciembre en la zona sur. En cuanto a su cosecha, comienza a mediados de octubre en el norte del país y a mediados de abril al sur.

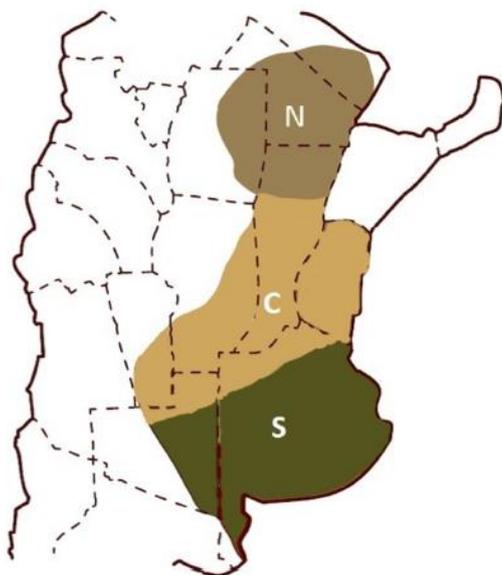


Fig 1. Principales áreas de cultivo de girasol en Argentina (Castaño, 2018)

La importancia económica del girasol reside principalmente en la obtención de aceite, siendo éste el cuarto en orden de importancia a nivel mundial, luego del

aceite de palma, soja y colza. Además, las semillas de girasol son utilizadas para la obtención de harina y como insumo forrajero para la producción de carne y leche (ASAGIR, 2018).

La dormición de semillas de girasol, que ocurre principalmente en aquellas provenientes de contraestación, representa un importante retraso para la siembra inmediata y conlleva dificultades en su comercialización. Por otra parte, las demandas actuales y futuras de alimentos y bioenergía, ante el crecimiento demográfico, cambio climático global y la escasa o nula posibilidad de incrementar la superficie cultivable desafían a reducir las brechas entre los rendimientos potenciales con respecto a los alcanzados en este cultivo. La germinación de semillas es uno de los principales factores que afectan a los sistemas productivos. La germinación y la emergencia de las plántulas deben producirse rápida y uniformemente, para obtener plantas similares en tamaño y con una distribución por unidad de superficie que permita explotar óptimamente los recursos ambientales (Aguirrezábal et al., 1996). Para llegar a cumplir con esta meta, es necesario disponer de semillas de calidad que puedan germinar de manera adecuada.

Descripción del material vegetal

Helianthus annuus L., comúnmente denominado girasol, es una planta herbácea anual de gran tamaño perteneciente a la familia de las Asteráceas. El fruto del girasol se denomina cipsela (usualmente llamado semilla) y consiste en un pericarpo duro y fibroso que recubre a la semilla propiamente dicha. Esta última está compuesta por el embrión, formado por el eje embrionario y los cotiledones (Fig. 2), y la testa o tegumento seminal.

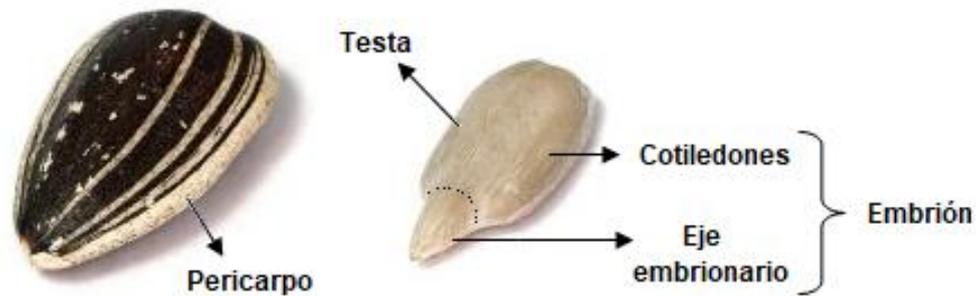


Fig. 2. Cipsela: pericarpio y semilla de girasol.

Germinación y dormición en girasol

La germinación es el proceso comprendido entre la imbibición de la semilla, con la consecuente expansión y elongación celular, y la profusión de la radícula a través de las cubiertas seminales. Durante este proceso ocurren alteraciones a nivel morfológico y fisiológico que dan como resultado la activación metabólica del embrión (Miransari y Smith, 2014). Entre los factores que afectan la germinación, la dormición es probablemente el más importante. La dormición se define como la incapacidad de la semilla para germinar ante condiciones favorables y es un mecanismo adaptativo que evita la germinación precoz ante condiciones ambientales inapropiadas. La mantención o liberación de la dormición depende de la luz, temperatura y disponibilidad de agua. La respuesta precisa de la semilla a estos factores ambientales está mediada por vías hormonales (Skubacz y Daszkowska-Golec, 2017).

En girasol, la dormición está controlada tanto por el embrión como por las cubiertas de seminales (testa y pericarpio) y/o una combinación de ambas. La dormición impuesta por el embrión comprende un corto período de tiempo, mientras que la inducida por la testa y el pericarpio persiste generalmente por más de 32 semanas (Brunick, 2007). En cuanto a la persistencia de la dormición en girasol, la misma puede variar según el genotipo desde varias semanas hasta casi un año, mostrando los híbridos elevados niveles de dormición en relación a otros genotipos cultivados (Maiti et al., 2006; Benech-

Arnold et al., 2013), lo cual afectará la calidad de la semilla y con ello la germinación.

En los sistemas productivos, la dormición en semillas es una característica no deseada, ya que una germinación rápida y uniforme es requerida después de la siembra. Diferentes tratamientos tales como estratificación de semillas a bajas temperaturas, aplicación de compuestos nitrogenados, escarificación y aplicaciones exógenas de fitohormonas se han implementado a fin de superar el problema de dormición (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein et al., 2008; Nasreen et al., 2015).

Fitohormonas en la regulación de la germinación y dormición de semillas

Las fitohormonas desempeñan papeles claves en la regulación de la mayoría de los procesos biológicos involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plantas, a través de relaciones sinérgicas o antagónicas entre ellas. Entre estos procesos se encuentran la dormición y germinación, los cuales son modulados principalmente por Ácido Abscísico (ABA) y Giberelinas (GAs) a través de una relación antagónica. Durante la maduración de la semilla, el ABA se acumula provocando la inducción y mantención de la dormición, previniendo la germinación de la semilla antes de su dispersión (viviparidad). El mantenimiento de la dormición también depende de una alta relación ABA/GA mientras que su aliviación implica un cambio neto hacia un aumento de la biosíntesis de GAs y un catabolismo de ABA, es decir una baja relación ABA/GA (Skubacz y Daszkowska-Golec, 2017).

Si bien ABA y GAs son las hormonas tradicionales implicadas en la regulación de la germinación y dormición recientemente se ha demostrado que otros grupos hormonales, tales como brasinosteroides (BRs) y estrigolactonas (SLs) participan también en la regulación de dichos procesos (Shu et al., 2016). Sin embargo, se requieren más estudios para contribuir a dilucidar el rol de estas hormonas en la regulación de la germinación/dormición.

Ácido Abscísico (ABA)

ABA es un sesquiterpenoapocarotenoide de 15 átomos de carbono, con un anillo alifático y una cadena lateral. La cadena lateral contiene dos enlaces conjugados ubicados hacia el extremo carboxílico. La orientación del grupo carboxilo del C-2 da lugar a la existencia de los isómeros *cis* y *trans*, siendo la forma *cis* la que presenta actividad biológica.

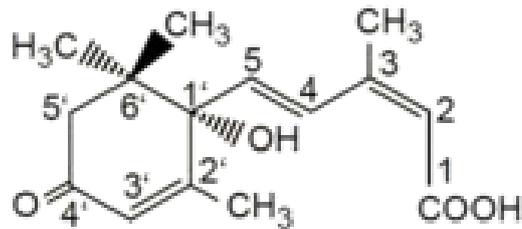


Fig. 3. Estructura química del ácido abscísico.

La biosíntesis de ABA se inicia en plastidios y finaliza en citosol. En las primeras etapas, en los plastidios, ocurre la desaturación de fitoeno por la enzima fitoenodesaturasa para producir licopeno, el cual luego por la acción de la enzima licopeno β -ciclasa da lugar a β -caroteno. Posteriormente, ocurre la hidroxilación del β -caroteno por la β -caroteno hidroxilasa produciéndose zeaxantina, que por acción de la enzima zeaxantinaepoxidasa (ZEP) produce violaxantina. La última conversión que ocurre dentro de este compartimento es la de violaxantina a 9-*cis*-violaxantina o 9-*cis*-neoxantina que da lugar a xantoxina en una reacción catalizada por la 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), enzima clave de la biosíntesis de ABA. La xantoxina es transportada al citosol, donde ocurren dos reacciones enzimáticas para dar lugar al ABA. Primero, actúa una dehidrogenasa/ reductasa de cadena corta (SDR) que da lugar a ABA aldehído y finalmente ocurre la oxidación de ABA aldehído a ABA a través de la enzima ABA aldehído oxidasa (AAO) (Fig. 4).

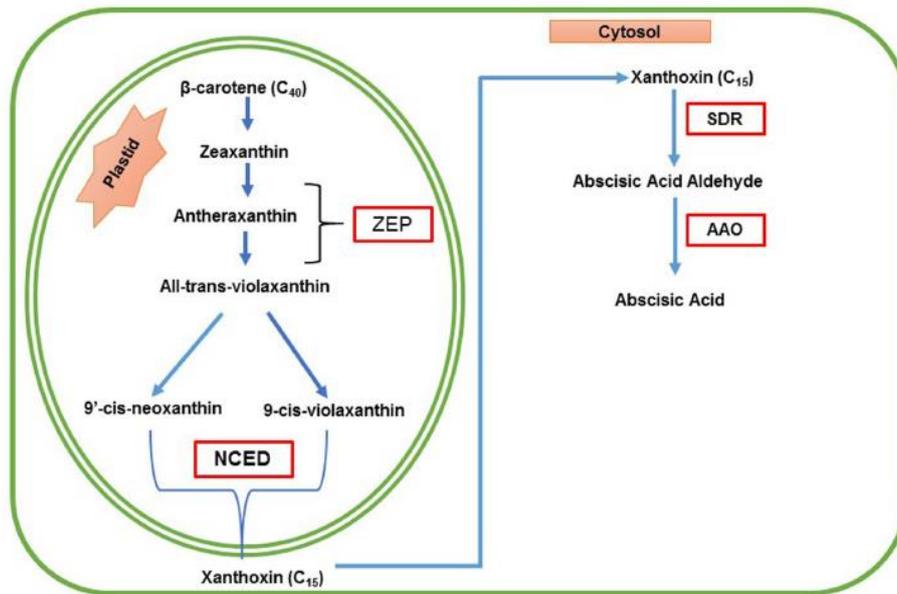


Figura 4. Biosíntesis de ABA (Sah et al., 2016).

Los efectos fisiológicos de ABA están relacionados a procesos del crecimiento y desarrollo y respuesta a estrés. En el desarrollo embrionario, ABA cumple funciones muy importantes. En el desarrollo medio o etapa de maduración, regula la síntesis de proteínas relacionadas a la tolerancia a la desecación e inhibe la viviparidad. En el desarrollo tardío o desecación, el ABA estaría implicado en la inmovilización de sustancias de reserva y en la inducción de la dormición. Específicamente en germinación y dormición, ABA provoca la inducción y la mantención de la dormición a fin de prevenir la viviparidad, evitando así la germinación de la semilla antes de su dispersión (Shu et al., 2016).

En plantas superiores, una de las respuestas a estrés hídrico consiste en un aumento en el contenido de ABA, el cual reduce la transpiración mediante el cierre de los estomas e induce la síntesis de proteínas que favorecen la tolerancia a la desecación (proteínas LEAs, late embryogenesis abundant protein). Los niveles de ABA también se incrementan en respuesta a otros tipos de estrés, como lesiones, estrés salino o térmico. Esta hormona también está implicada en la abscisión, induciendo la síntesis de otra fitohormona, el etileno, el cual induce enzimas implicadas en la degradación de la lámina media y la pared celular (Sah et al., 2016).

Estrigolactonas (SLs)

Las SLs constituyen un grupo de fitohormonas descubiertas a partir de exudados radicales, capaces de estimular la germinación de semillas de plantas parásitas de los géneros *Striga*, *Orobanche*, *Alectra*, y *Phelipanche* (Mishra et al., 2017), y estimular la simbiosis con hongos micorrízicos. En cuanto a su estructura química, estas hormonas son lactonasterpenoides y consisten en una molécula de 3 anillos con un grupo cetona, unido a un butenolide a través de una unión enoléter (Fig. 5).

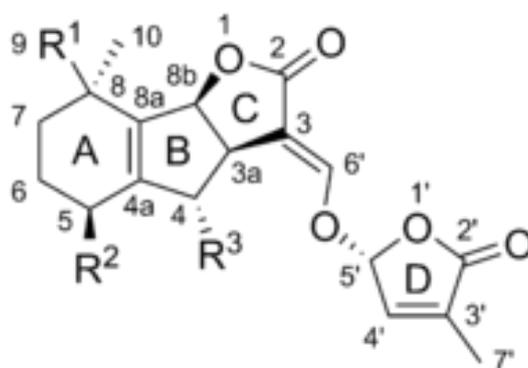


Fig. 5. Estructura química de estrigolactonas.

Las SLs son derivados de la carlactona. Su ruta de biosíntesis tiene lugar en dos compartimentos celulares, plastidios y citosol. En plastidios, a partir de trans- β -caroteno se obtiene carlactona a través de dos intermediarios. En primer lugar a partir de trans- β -caroteno por acción de la enzima trans/9-cys- β -caroteno isomerasa (D27) se obtiene 9-cys- β -caroteno. Luego mediante una reacción catalizada por la enzima CCD7 (carotenoid cleavage dioxygenase 7), se produce 9-cys- β -apo-10'-carotenal, el cual mediante la actividad enzimática de CCD8 da lugar a la formación de carlactona. Posteriormente este compuesto es transportado al citosol, dónde una citocromo 450 monooxigenasa (MAX1) y otras enzimas aún no identificadas catalizan la síntesis de SLs (Fig. 6).

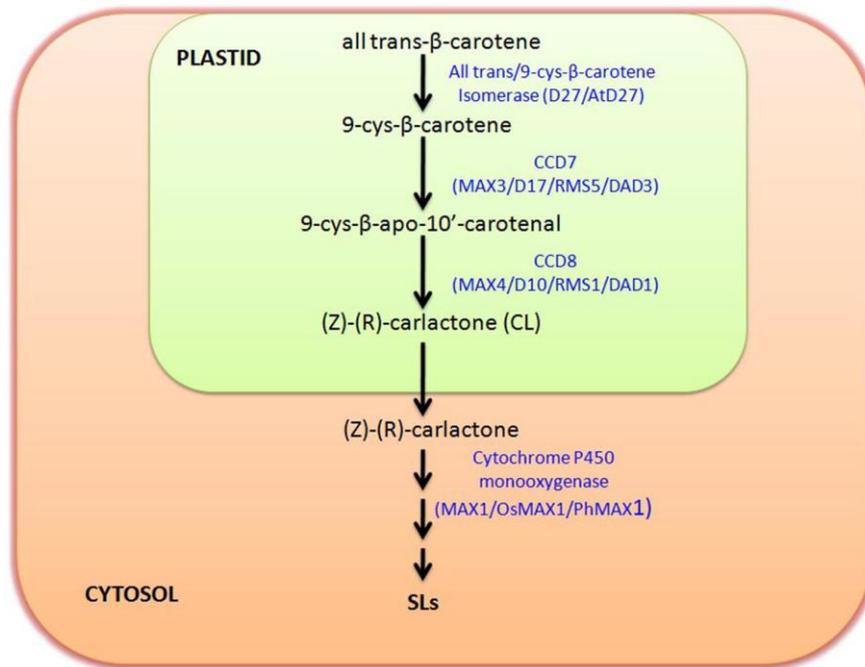


Figura 6. Biosíntesis de estrigolactonas (Mishra et al., 2017).

Las SLs están involucradas en numerosos aspectos relacionados al desarrollo de la planta: coordinan el crecimiento y la arquitectura de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes, regulan el crecimiento y la elongación de las raíces e inhiben la ramificación secundaria, estimulan el crecimiento de entrenudos mediante un cross-talk con auxinas y modulan la senescencia foliar. SLs también participan junto a otras fitohormonas en la modulación de la respuesta frente a condiciones ambientales desfavorables. En relación a germinación, dichas fitohormonas están involucradas en la germinación de semillas y en el crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*. En este sentido, Toh et al. (2012) reportaron que SLs aliviarían la termoinhibición en semillas de *Arabidopsis* a través modular la relación ABA/GAs.

Brasinoesteroides (BRs)

El estudio de este grupo de reguladores del crecimiento vegetal comenzó luego del aislamiento y caracterización inicial de brasinolide a partir del polen de *Brassica napus*. Actualmente se han caracterizado más de 50 BRs, siendo los más abundantes brasinolide (BL) y castasterona (CS).

Respecto a su estructura química los BRs cuentan con cuatro anillos (A, B, C y D) y una cadena lateral. Son sintetizados a partir de la condensación de bloques de cinco átomos de carbonos denominados isoprenos. Los BRs pueden tener 27, 28 o 29 átomos de carbono, siendo los más ampliamente distribuidos los que poseen 28 carbonos. Las variaciones estructurales están dadas por la presencia de un átomo de oxígeno en las posiciones C2, C3 y C6 de los anillos A y B, y en las posiciones C22 y C23 de la cadena lateral.

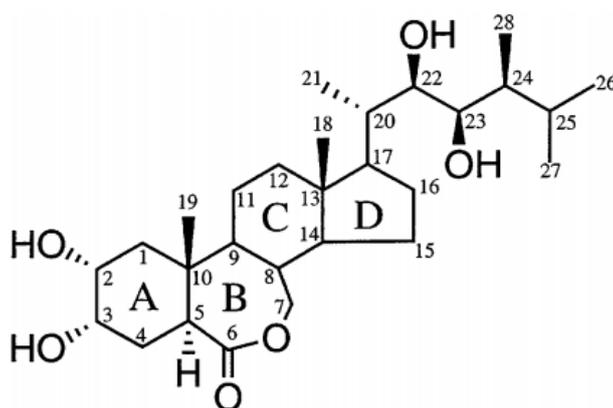


Figura 7. Estructura química de brasinoesteroides.

La síntesis de los BRs ocurre en el estroma de los plastidios, y los gránulos de almidón son los sitios de almacenaje de estas fitohormonas (Hernández Silva y García-Martínez, 2016). Las primeras reacciones biosintéticas, incluyen la transformación de escualeno a campesterol (CR), incluyendo como intermediarios a cicloartenol, episterol, 5-dehidroepisterol y 24-metilcolesterol. El CR puede continuar por tres vías diferentes pero interconectadas de síntesis hasta llegar a la formación de brasinolide. En el primer punto de ramificación, CR puede seguir la vía de oxidación tardía del carbono 22 a través de la enzima CPD o por la vía de oxidación temprana, a través de la enzima DWF4. En el segundo punto de bifurcación, campestanol (CN) puede seguir la vía de oxidación tardía o la vía de oxidación temprana del C-6. Todas las vías de síntesis involucradas vuelven a converger en la formación de CS, la cual finalmente da lugar a BL (Chung y Choe, 2013; Hernández Silva y García-Martínez, 2016).

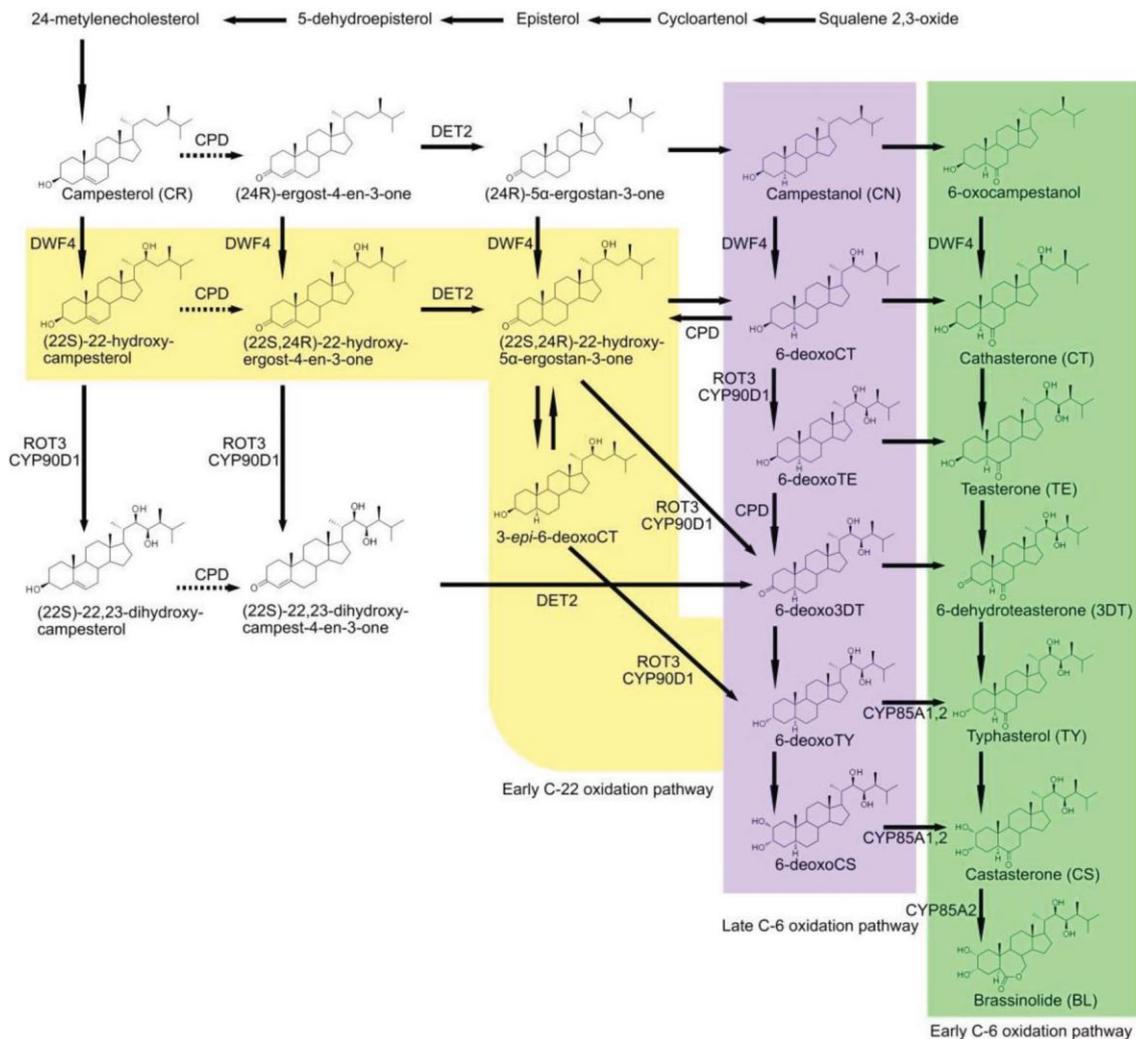


Figura 8. Biosíntesis de Brasiñoesteroides (Chung y Choe, 2013).

Los BRs regulan numerosos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, estimulan la elongación celular, tienen efectos sobre la fotomorfogénesis y senescencia, inhiben el crecimiento de la raíz, inducen la síntesis de etileno, el desarrollo vascular y reproductivo, incrementan el tamaño y cantidad de frutos, aumentan la resistencia a factores ambientales desfavorables, entre otros efectos (Khripach et al, 2000; Mazorra y núñez, 2008). Particularmente en lo referente a germinación, los BRs antagonizan la acción de ABA, estimulando la germinación de las semillas, específicamente a través del gen *MADRE DE FT Y TFL1* (MFT) (Xi et al., 2010; Je et al., 2010), el cual regula negativamente la señalización de ABA. Otros estudios demuestran que BIN2 (Brassinosteroid Insensitive 2), un represor clave de la señalización de BRs, interactúa y fosforila a ABI5 para regular positivamente la respuesta a

ABA durante la germinación de la semilla, mientras que la aplicación exógena de epibrasinolide suprime la actividad de BIN2 para antagonizar el papel inhibitorio de ABA (Hu y Yu, 2014).

HIPÓTESIS

Brasinoesteroides (BRs) y estrigolactonas (SLs) desempeñan un rol clave en la regulación de la germinación y dormición de semillas de girasol a través de la acción concertada con ácido abscísico (ABA).

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la interacción de brasinoesteroides, estrigolactonas y ácido absísico en la germinación y dormición de semillas de líneas endocriadas de girasol con diferentes niveles de dormición a cosecha.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar el nivel de dormición de semillas de líneas endocriadas de girasol al momento de cosecha (0 días).
2. Determinar el poder germinativo de semillas de líneas endocriadas de girasol con dormición a cosecha luego de la aplicación de tratamientos exógenos de reguladores del crecimiento.
3. Cuantificar los niveles endógenos de ABA, BRs y SLs en eje embrionario, cotiledones, pericarpo y testa de semillas secas de líneas endocriadas de girasol al momento de la cosecha.
4. Dilucidar los cambios en el metabolismo hormonal que ocurren en eje embrionario por efecto de tratamientos exógenos con reguladores del crecimiento durante la ruptura de la dormición.
5. Correlacionar el poder germinativo de las semillas con los niveles hormonales endógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron cipselas (semilla + pericarpo) de tres líneas endocriadas de girasol Xi3, Xi3dm y X274 provistas por la Ing. Agr. Marisa Della Maddalena de la Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA), Pergamino, Argentina.

Determinación de poder germinativo

Veinticinco cipselas (por repetición) se sembraron en bandejas entre toallas de papel húmedo y se colocaron a germinar en Cuartos Ambientales PR48 Conviron (8 h osc/18°C/90% HR y 16 h luz/28°C/80% HR). El recuento de germinación se efectuó a los 10 días post-siembra. Se consideraron germinadas aquellas semillas que presentaron la emergencia de la radícula. Las experiencias se llevaron a cabo por cuadruplicado.

Obtención de eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo para la determinación de niveles hormonales endógenos

Veinticinco cipselas (por repetición) se seccionaron cuidadosamente en eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo. Posteriormente se congelaron en N₂ líquido se liofilizaron y conservaron a -20°C hasta su uso. Las experiencias se efectuaron por cuadruplicado.

Tratamientos exógenos con reguladores del crecimiento y determinación de niveles hormonales endógenos

Los tratamientos con reguladores del crecimiento se efectuaron sobre 100 cipselas de las líneas Xi3 y Xi3dm contenidas en recipientes plásticos herméticos, en los que se dispersó la solución hormonal correspondiente (50 µl de solución/gr de cipselas) con micropipeta, realizando agitación vigorosa durante 2 minutos para facilitar su penetración en el tejido. Las experiencias se realizaron por cuadruplicado.

Los tratamientos hormonales aplicados fueron:

C: cipselas intactas tratadas con agua deionizada.

T1: cipselas intactas tratadas con baja concentración de GA₃.

T2: cipselas intactas tratadas con concentración intermedia de GA₃.

T3: cipselas intactas tratadas con alta concentración N°1 de GA₃.

T4: cipselas intactas tratadas con ácido salicílico (SA).

T5: cipselas intactas tratadas con ácido indol-3-acético (AIA) en baja concentración.

T6: cipselas intactas tratadas con concentración intermedia de AIA.

T7: cipselas intactas tratadas con alta concentración de AIA.

T8: cipselas intactas tratadas con baja concentración de 6-bencilaminopurina (6-BAP).

T9: cipselas intactas tratadas con alta concentración de 6-BAP.

T10: cipselas intactas tratadas con alta concentración N°2 de GA₃.

T11: cipselas intactas tratadas con Ethephon.

T12: cipselas intactas tratadas con alta concentración N°2 de GA₃ + Ethephon

Nota: las concentraciones utilizadas no se proveen, con el fin de proteger la posible transferencia de estos resultados.

Las determinaciones hormonales endógenas se hicieron en eje embrionario de semillas control y tratadas a las 0, 3, 6 y 12 h de imbibición según la metodología descrita anteriormente. Las experiencias se efectuaron por cuadruplicado.

Extracción, purificación, identificación y cuantificación de niveles hormonales endógenos

La extracción y purificación de ABA, BRs (CS) y SLs (deoxiestrigol) se llevó a cabo según protocolo de Durgbanshi et al. (2005) con modificaciones. Para ello, 200 mg de peso seco de material vegetal se trituró en mortero con N₂ líquido y 5 ml de agua deionizada (solvente de extracción). Los extractos se transvasaron a tubos Falcon de 50 ml, para posteriormente adicionar 50 ng de los respectivos estándares deuterados de cada hormona. Cada muestra se pasó brevemente por ultraturrax para completar la homogeneización y facilitar la equilibración de estándares. Luego se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. Se colectó el sobrenadante y se ajustó el pH a 2,8-3,2 con ácido acético 30%. Posteriormente se efectuó una doble partición con éter etílico, descartando las fases acuosas y recogiendo las fases orgánicas, llevándose luego a sequedad en evaporador rotativo. Finalmente, los extractos se filtraron a través de un filtro de celulosa utilizando una cámara de vacío y se llevó a sequedad en SpeedVac.

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) con un volumen de inyección de 10 µl. La elución de ABA y BRs se llevó a cabo en gradiente con un sistema de solvente binario: 0.2% HOAc en H₂O (solvente B) / MeOH (solvente A) a 25°C y 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). Para la elución de SLs se utilizó un gradiente inicial metanol:agua (20:80, v/v) el que alcanzó a los 25 min una proporción 80:20 (v/v) a 28°C. Al final de cada corrida se establecieron 7 min de equilibración del sistema y columna. La identificación y cuantificación de los niveles hormonales endógenos 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 (ESI⁻). La identificación y cuantificación de ABA y BRs se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo MRM (Reacciones de Monitoreo Múltiples),

mientras que las SLs se identificaron y cuantificaron en modo SIR (Reacción Selectiva de Iones). La adquisición de datos por MRM se realizó por monitoreo de iones parentales y transiciones para ABA (m/z 263/153), D₆-ABA (m/z 269/159) y CS (m/z 464/217) y D₃-CS (m/z 467/386). En el modo SIR los datos fueron adquiridos a través del monitoreo de la molécula de deoxiestrígol (234 m/z). Los valores se expresan en pmol de hormona por gr PS⁻¹. El software utilizado fue MassLynx TM V.4.1. La experiencia se llevó a cabo por cuadruplicado.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2013, InfoStat/Profesional V. 2012) empleando el test ANNOVA por comparación de medias de las variables evaluadas. Se empleó a posteriori un test de Rangos Múltiples de diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher; $p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Determinación de poder germinativo

Como se observa en la Fig. 9, el poder germinativo (PG) de la línea Xi3 fue de 7,75% y el de la línea Xi3dm 16,5%; es decir ambas líneas presentan dormición al momento de cosecha. El PG de la línea X274 fue de 94,75%, por lo tanto, las semillas de esta línea fueron caracterizadas como no dormidas.

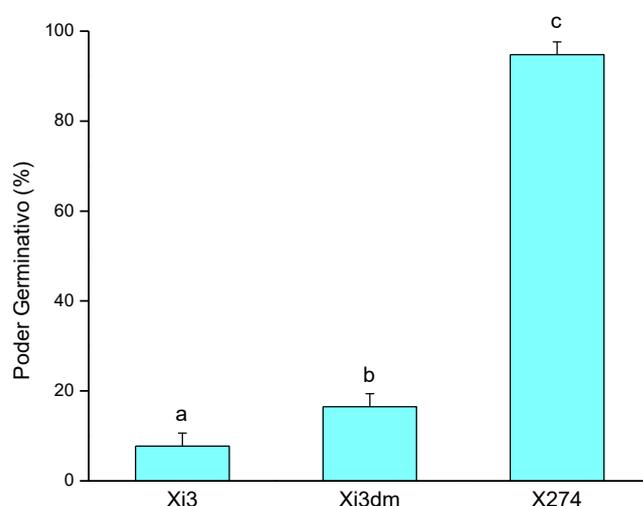


Fig. 9. Poder germinativo de semillas de girasol de las líneas Xi3, Xi3dm y X274 (n=4 ± ES). Letras diferentes indican diferencias significativas a p<0.05.

Determinación de poder germinativo luego de la aplicación exógena de reguladores del crecimiento

Los tratamientos exógenos con reguladores del crecimiento se ensayaron únicamente en las líneas Xi3 y Xi3dm debido a que estas dos líneas fueron las que presentaron dormición al momento de cosecha.

En la Fig.10 se muestra el PG de cipselas de la línea Xi3 tratadas con diferentes soluciones de reguladores del crecimiento. Los tratamientos exógenos que incrementaron significativamente el PG respecto a las cipselas control fueron los correspondientes a GA₃ en altas concentraciones N°2,

Ethephon y GA₃ en altas concentraciones N°2 + Ethephon (T10, T11 y T12 respectivamente).

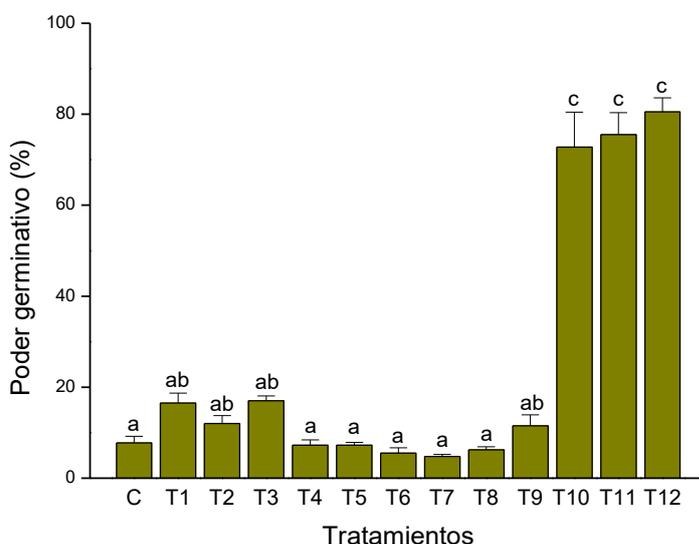


Fig. 10. Poder germinativo de semillas de girasol de la línea Xi3 luego de la aplicación de tratamientos exógenos con regulares del crecimiento. C: control, T1: GA₃ concentración baja, T2: GA₃ concentración intermedia, T3: GA₃ alta concentración N°1, T4: SA, T5: AIA baja concentración, T6: AIA concentración intermedia, T7: AIA alta concentración, T8: 6-benciladenina baja concentración, T9: 6-benciladenina alta concentración, T10: GA₃ alta concentración N°2, T11: ethephon, T12: GA₃ alta concentración N°2 + ethephon.

En la línea Xi3dm los tratamientos correspondientes a aplicaciones exógenas de SA, AIA en concentraciones baja, intermedia y alta, 6-BAP en concentración intermedia y alta, GA₃ en alta concentración (N°1 y N°2), ethephon y GA₃ en alta concentración N°2 + ethephon, aumentaron de manera significativa el PG en comparación al tratamiento control (Fig. 11).

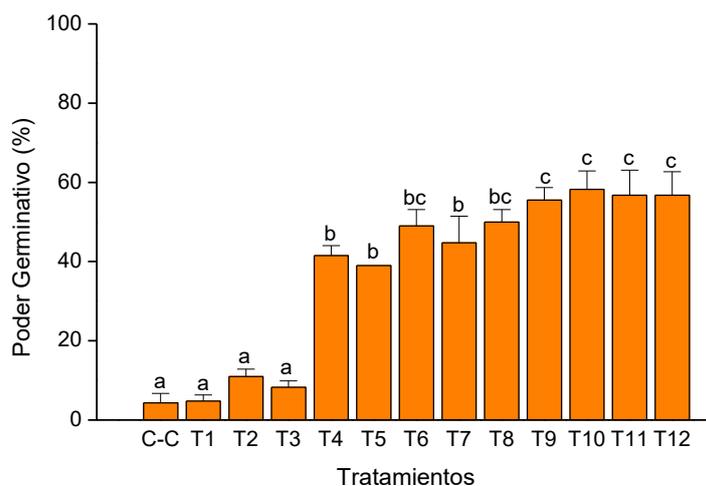


Fig. 11. Poder germinativo de semillas de girasol de la línea Xi3dm luego de la aplicación de los tratamientos exógenos con regulares del crecimiento. C: control, T1: GA₃ concentración baja, T2: GA₃ concentración intermedia, T3: GA₃ alta concentración N°1, T4: SA, T5: AIA baja concentración, T6: AIA concentración intermedia, T7: AIA alta concentración, T8: 6-benciladenina baja concentración, T9: 6-benciladenina alta concentración, T10: GA₃ alta concentración N°2, T11: ethephon, T12: GA₃ alta concentración N°2 + ethephon.

Determinación de niveles hormonales endógenos en eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo

Niveles endógenos de ABA, deoxiestrigol y CS se midieron en embrión, eje embrionario y cotiledones, y en cubiertas seminales, testa y pericarpo de las líneas Xi3, Xi3dm y X274 (Figs. 12, 13, 14).

Niveles endógenos de ABA

Las líneas Xi3 y Xi3dm, ambas con dormición a cosecha, presentaron mayores niveles endógenos de ABA en embrión (eje embrionario + cotiledones), mientras que en la línea X274, sin dormición, los niveles de ABA fueron superiores en las cubiertas seminales (testa + pericarpo) (Figs. 12A, 12B).

La línea Xi3 presentó mayores niveles de ABA tanto en eje embrionario como en cotiledones respecto a las otras dos líneas. En ambas líneas con dormición a cosecha, Xi3 y Xi3dm, el eje embrionario presentó mayor nivel endógeno de

ABA (aproximadamente 3 veces) respecto a los cotiledones. En la línea X274 se registraron diferencias significativas entre eje embrionario y cotiledones.

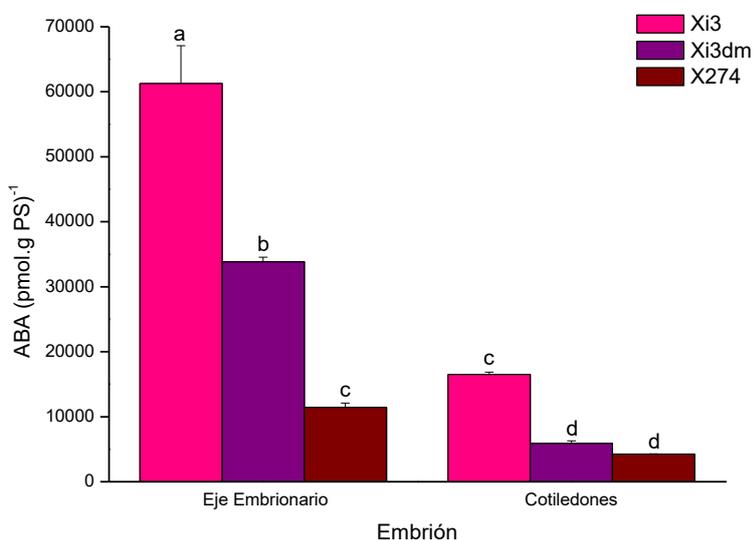


Fig. 12A. Niveles endógenos de ABA (pmol. g PS^{-1}) en eje embrionario y cotiledones de semillas secas de las líneas Xi3, Xi3dm y X274 ($n=4 \pm \text{ES}$). Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0.05$.

En lo que respecta a las cubiertas seminales, los niveles de ABA cuantificados en testa y pericarpo de la línea Xi3 mostraron diferencias significativas, siendo aproximadamente dos veces menor en este último tejido. En la línea Xi3dm también se registró mayor nivel endógeno de ABA en testa, aunque la diferencia entre ambos tejidos fue algo menor que en la línea Xi3. En la línea X274, contrariamente a lo observado en las otras líneas, los niveles de ABA resultaron significativamente mayores en pericarpo (Fig. 12B).

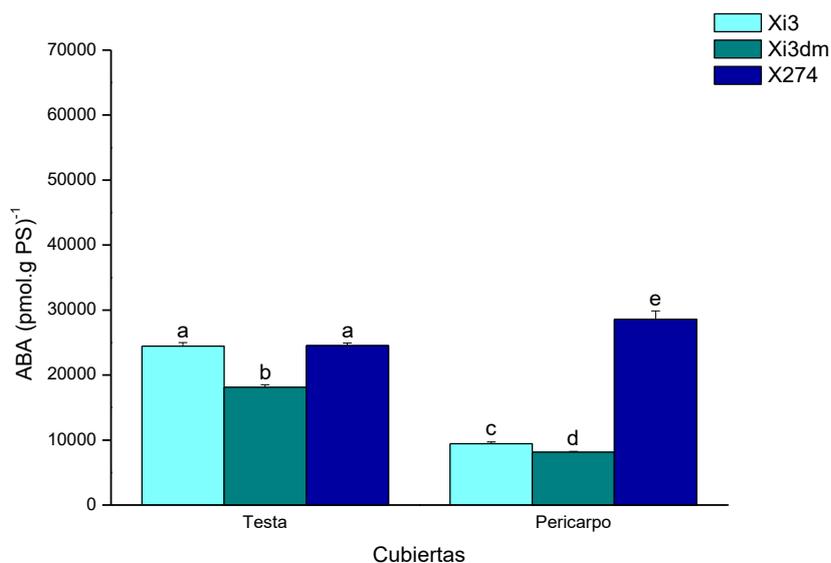


Fig. 12B. Niveles endógenos de ABA (pmol.g PS^{-1}) en testa y pericarp de semillas secas de las líneas Xi3, Xi3dm y X274 ($n=4 \pm \text{ES}$). Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0.05$.

Niveles endógenos de Deoxiestrigol

Los mayores niveles endógenos de deoxiestrigol se registraron en la testa, mientras que el pericarp presentó los menores niveles en todas las líneas analizadas. En cuanto a los tejidos que constituyen el embrión (eje embrionario + cotiledones) presentaron un nivel endógeno intermedio (Figs. 13A, 13B).

En la Fig. 13A, se observa una tendencia opuesta en los niveles endógenos de deoxiestrigol en eje embrionario y cotiledones de las líneas Xi3 y Xi3dm. Es decir, en Xi3 deoxiestrigol fue significativamente menor en eje embrionario respecto a cotiledones, mientras que en la línea Xi3dm los menores niveles se registraron en cotiledones. No se registraron diferencias significativas en los niveles endógenos de deoxiestrigol de eje embrionario Xi3 y cotiledones Xi3dm, como así tampoco en la relación inversa (cotiledones Xi3 y eje embrionario Xi3dm).

Respecto a la línea X274, deoxiestrigol fue significativamente mayor en ambos tejidos en comparación con las otras dos líneas analizadas. Diferencias

significativas fueron detectadas entre eje embrionario y cotiledones X274, siendo menor el nivel de deoxiestrígol en cotiledones.

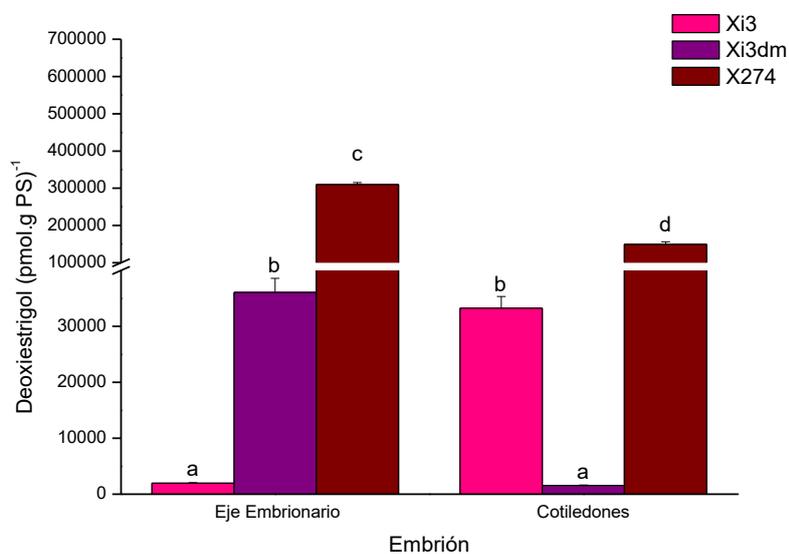


Fig. 13A. Niveles endógenos de deoxiestrígol (pmol. g PS^{-1}) en eje embrionario y cotiledones de semillas secas de las líneas Xi3, Xi3dm y X274 ($n=4 \pm \text{ES}$). Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0.05$.

Respecto de las cubiertas seminales, específicamente en testa deoxiestrígol presentó diferencias significativas entre las tres líneas, siendo la testa Xi3 la que mostró una menor concentración y la de X274 la que arrojó un valor mayor. En pericarpo no se observaron diferencias significativas entre las líneas (Fig. 13B).

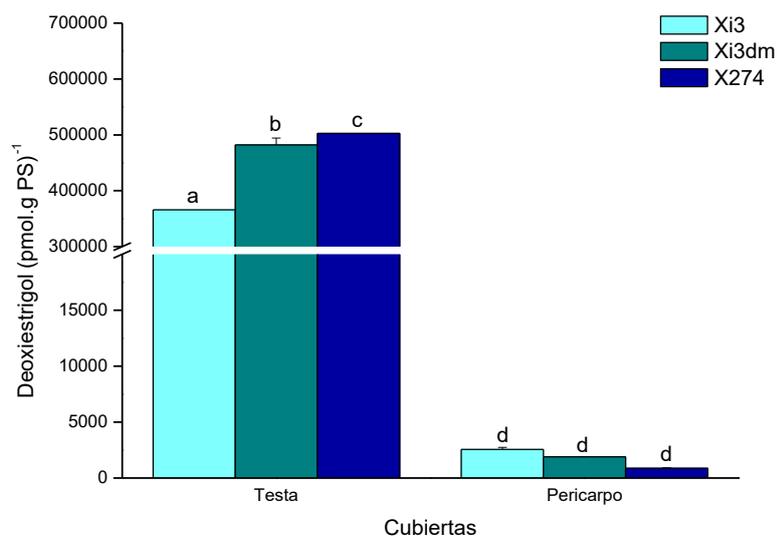


Fig. 13B. Niveles endógenos de deoxiestrigo (pmol.g PS^{-1}) en testa y pericarp de semillas secas de las líneas Xi3, Xi3dm y X274 ($n=4 \pm \text{ES}$). Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0.05$.

Niveles endógenos de CS

En la línea Xi3, los niveles de CS cuantificados en los dos tejidos que conforman al embrión fueron inferiores a los de las otras dos líneas, no obstante, no se observaron diferencias significativas entre eje embrionario y cotiledones. Por el contrario en la línea Xi3dm se registraron altos niveles endógenos, aunque no hubo diferencia entre los tejidos. En cuanto a la línea X274, la concentración de CS fue mayor en eje embrionario respecto a cotiledones (Fig. 14A).

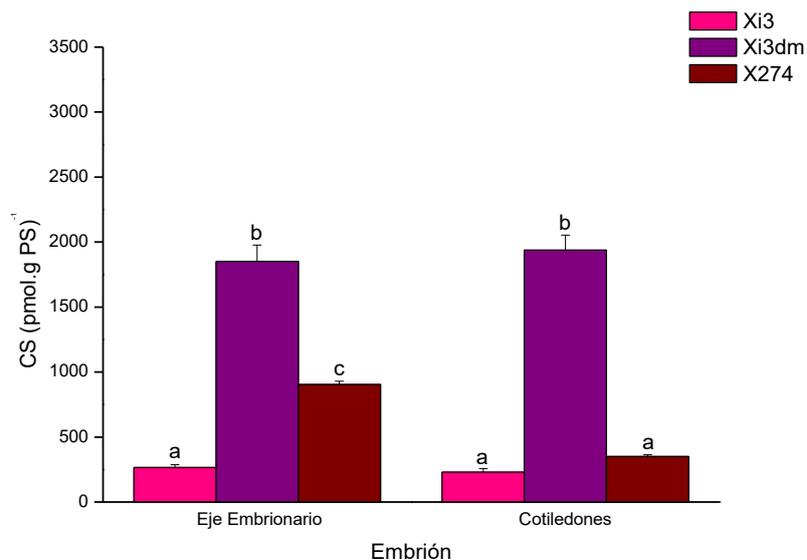


Fig. 14A. Niveles endógenos de CS (pmol.g PS)⁻¹ en eje embrionario y cotiledones de semillas secas de las líneas Xi3, Xi3dm y X274 (n=4 ± ES). Letras diferentes indican diferencias significativas a p<0.05.

En la cuantificación de CS en cubiertas seminales, específicamente en pericarpo, no se detectaron diferencias entre líneas, pero los niveles resultaron significativamente menores a lo registrado en testa. En testa, altos niveles endógenos fueron cuantificados en Xi3 mientras que la línea Xi3dm presentó niveles endógenos inferiores al resto de las líneas (Fig. 14B).

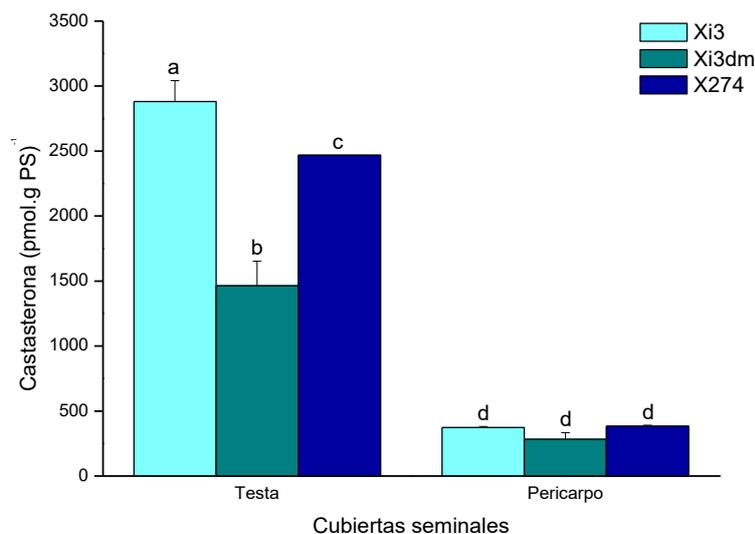


Fig. 14B. Niveles endógenos de CS (pmol.g PS)⁻¹ en testa y pericarp de semillas secas de las líneas Xi3, Xi3dm y X274 (n=4 ± ES). Letras diferentes indican diferencias significativas a p<0.05.

Efecto de tratamientos exógenos efectivos en la ruptura de la dormición sobre los niveles hormonales endógenos de eje embrionario

La aplicación de tratamientos exógenos de reguladores del crecimiento efectivos en la ruptura de la dormición en semillas de girasol (GA₃ y Ethephon) modificaron los niveles endógenos de ABA, BRs y SLs en eje embrionario.

En lo que respecta a ABA, durante la imbibición todos los tratamientos redujeron de manera significativa el nivel endógeno de esta fitohormona respecto a las 0 h (semilla seca). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre la condición control y los tratamientos. Además, a las 3, 6 y 12 h de imbibición la concentración de ABA se mantiene constante tanto en la condición control como en todos los tratamientos (Fig.15).

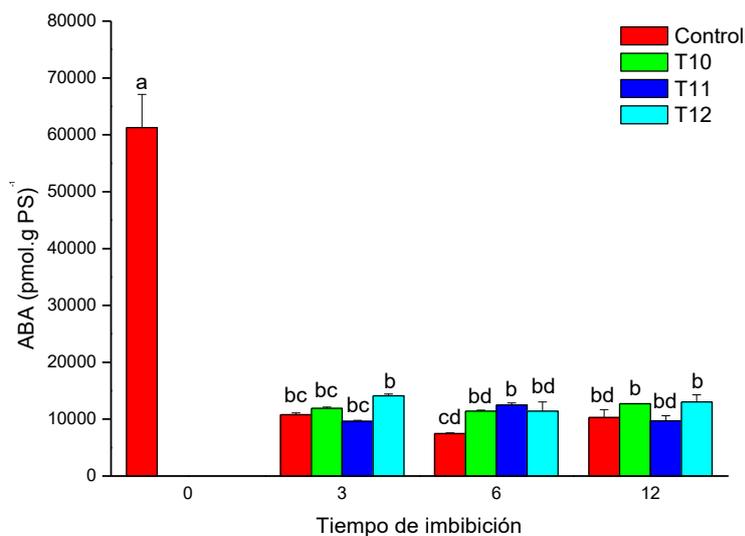


Fig. 15. Niveles endógenos de ABA (pmol. g PS^{-1}) en eje embrionario de semillas secas y embebidas de la línea Xi3 ($n=4 \pm \text{ES}$). Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$.

En relación a deoxiestrígol, se observó que en la condición control los niveles aumentaron considerablemente (400 veces aproximadamente) a las 3 h de imbibición y luego a partir de las 6 h disminuyeron en forma progresiva hasta las 12 h. En el tratamiento 10 (+GA₃), a las 3 y 6 h de imbibición no se detectaron diferencias significativas con respecto a las 0 h, sin embargo, a las 12 h se identificó un pico abrupto en la concentración de la hormona. En el tratamiento 11 (+ethephon), a las 3 h de imbibición no hubo diferencias significativas respecto a las 0 h. A las 6 h se observa un aumento significativo, disminuyendo a las 12 h. En cuanto al tratamiento 12, no se observaron diferencias significativas en los niveles de la hormona hasta las 12 h de imbibición, en dónde se registró un aumento significativo (Fig. 16).

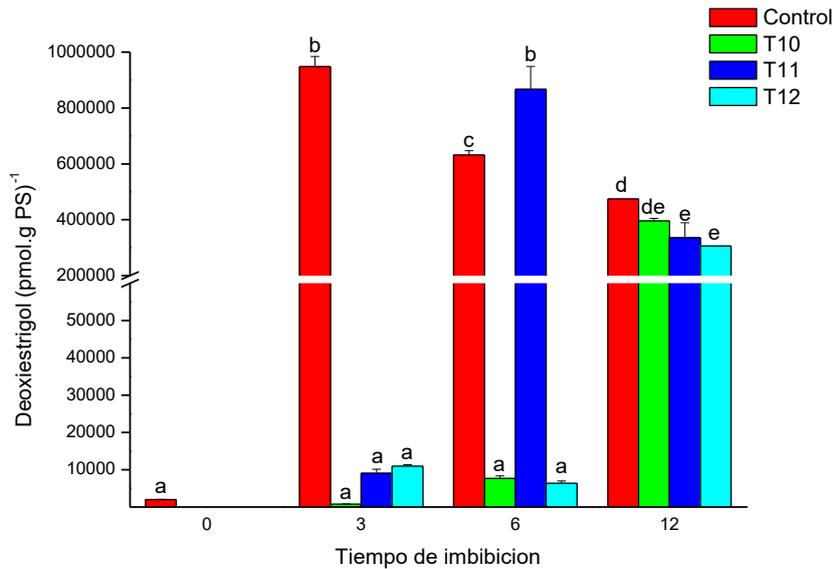


Fig. 16. Niveles endógenos de deoxiestrigol (pmol. g PS^{-1}) en eje embrionario de semillas secas y embebidas de la línea Xi3 ($n=4 \pm \text{ES}$). Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0.05$.

Respecto a CS, en la condición control aumentó progresivamente hasta las 6 h de imbibición para luego disminuir a las 12 h. El tratamiento +GA₃ en altas concentraciones N°2 (T10) elevó los niveles de CS a las 3 h de imbibición para luego mantenerse constantes hasta el final del experimento. El tratamiento +Ethephon (T11), incrementó los niveles de CS a las 3 h, para luego disminuir a las 6 h y finalmente aumentar a las 12 h de imbibición. El tratamiento combinado Ethephon + GA₃ (T12), ocasionó un notable incremento en el nivel endógeno de CS (4 veces mayor respecto 0h) a las 3 h de imbibición, posteriormente disminuyó a las 6 h, y nuevamente aumentó significativamente a las 12 h de imbibición, tiempo en el que se registró el pico más elevado en comparación con todos los tratamientos y todos los tiempos de imbibición analizados (Fig. 17).

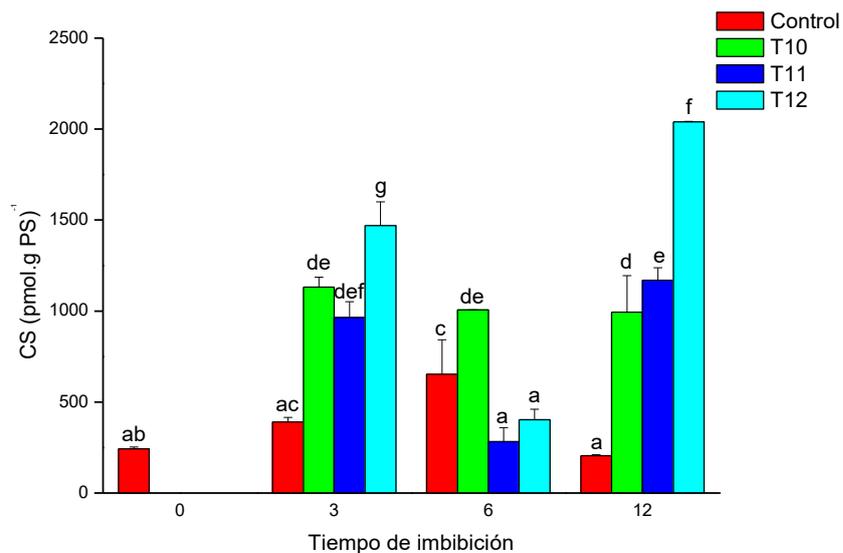


Fig. 17. Niveles endógenos de CS (pmol.g PS^{-1}) en eje embrionario de semillas secas y embebidas de la línea Xi3 ($n=4 \pm \text{ES}$). Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0.05$.

DISCUSIÓN

Las plantas, como organismos sésiles, han desarrollado una serie de mecanismos a fin de poder adaptarse a los cambios del ambiente. En este sentido, la dormición en las semillas es una estrategia que las plantas han desarrollado para evitar que las mismas germinen en condiciones ambientales desfavorables (Nonogaki, 2014; Bassel, 2016). Por esto, la capacidad de regular el nivel y tiempo de dormición de las semillas es considerado un rasgo importante en especies de interés agronómico tales como el girasol.

Particularmente en girasol se ha detectado alta variabilidad en el nivel de dormición entre diferentes genotipos (Maiti et al., 2006; Benech-Arnold et al., 2013), lo cual afecta la calidad de la semilla y con ello su germinación. Nuestros resultados nos permitieron caracterizar diferentes líneas endocriadas de la Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA) según el nivel de dormición en base a la capacidad germinativa. El alto porcentaje de germinación al momento de cosecha de la línea X274 indica que no posee dormición a cosecha. Por el contrario, semillas de las líneas Xi3 y Xi3dm mostraron bajo porcentaje de germinación al momento de cosecha, caracterizándose como altamente dormidas; siendo la línea Xi3 la que presentó un nivel mayor de dormición.

La germinación y dormición de semillas son procesos regulados por diferentes factores endógenos, entre ellos las fitohormonas (Shu et al., 2006). De hecho, su balance e interacción en los diferentes tejidos de la semilla (embrión y cubiertas seminales) determinan que ocurra o no su germinación (Penfield, 2017).

Ha sido ampliamente documentado para numerosas especies, tales como girasol (Roselló et al., 2016; Xia et al., 2018) y *Arabidopsis* (Preston et al., 2009) que el nivel de dormición de las semillas se correlaciona con un alto contenido ABA. Nuestros resultados mostraron que el nivel endógeno de ABA, fue mayor en eje embrionario y cotiledones de semillas con dormición a cosecha (Xi3 y Xi3dm) respecto a aquellas no dormidas (X274). Más aún, el mayor nivel de dormición de Xi3 se relaciona con un mayor nivel endógeno de ABA. Estos hallazgos, confirmarían que ABA es responsable de la imposición de la dormición impuesta por el embrión en semillas de girasol en concordancia

con lo observado por Roselló et al. (2016) y Xia et al. (2018). Sin embargo, los niveles endógenos de ABA de las cubiertas seminales (testa + pericarpo), no necesariamente están asociados con el nivel de dormición de las líneas estudiadas. En efecto, la dormición atribuida a las cubiertas seminales puede estar determinada tanto por factores químicos, físicos o ambos (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Baskin y Baskin, 2014). Por otro lado, los altos niveles de ABA detectados en cubiertas seminales de la línea X274 nos indicarían que esta hormona se podría estar acumulando como resultado de la extrusión desde el embrión durante la embriogénesis tardía permitiendo la germinación de estas semillas al momento de cosecha.

Recientemente, se ha puesto énfasis en la importancia de las SLs en la regulación de la germinación y dormición de semillas (Shu et al., 2016). Los mayores niveles endógenos de deoxiestrigol en tejidos del embrión (eje embrionario y cotiledones) de la semilla X274 indicarían la participación de las SLs en la germinación de semillas de girasol. En efecto, en *Arabidopsis* las SLs están involucradas en la germinación de semillas y crecimiento de la plántula (Toh et al., 2012; Shu et al., 2016).

Embriones de las líneas dormidas (Xi3 y Xi3dm) poseen altos niveles de ABA y bajo niveles de SLs, contrariamente a lo observado en la línea no dormida (X274). Así SLs y ABA jugarían un rol antagónico en la germinación de semillas de girasol. En efecto, Toh et al. (2012) observaron que las SLs estimulan la germinación de semillas de *Arabidopsis* a través de reducir el balance ABA/GAs.

Respecto a los BRs, ha sido demostrado que BRs y GAs actúan sinérgicamente promoviendo la germinación de semillas, contrarrestando así la acción inhibitoria de ABA (Oklestkova et al., 2015; Skubacz y Daszkowska-Golec, 2017). En nuestras condiciones experimentales no se observa una relación directa entre nivel de dormición y niveles endógenos de CS. Sin embargo, en eje embrionario y cotiledones de la línea X274 se cuantificaron mayores niveles de 24-epibrasinolide, otro BRs con actividad biológica, en relación a las líneas con dormición a cosecha (Xi3 y Xi3dm) (datos no mostrados). Estos hallazgos sugieren la importancia relativa de distintos BRs en la germinación de semillas de girasol; de hecho, los niveles endógenos de 24-epibrasinolide fueron superiores a CS en todos los tejidos de las líneas

analizadas. En este sentido, entre los BRs hay una fuerte relación estructura-bioactividad, siendo 24-epibrasinolide más activo en la promoción del crecimiento que CS (Liu et al., 2017).

La presencia de dormición en las semillas de cultivos de importancia económica, como el girasol, es una característica no deseada ya que una germinación rápida y uniforme es requerida después de la siembra. En este sentido dependiendo del tipo de dormición de las semillas de girasol se han desarrollado diferentes tratamientos a fin de superar este problema (Maiti et al., 2006; Adams y TeBeest, 2016; Dominguez et al., 2018). El alto porcentaje de germinación observado en semillas de las líneas Xi3 y Xi3dm (con dormición a cosecha), tratadas con GA₃ (alta concentraciones N°2) y ethephon, solos o combinados confirma la importancia y eficacia de estos tratamientos en la ruptura de la dormición en girasol. En relación a esto, es ampliamente conocido que las GAs promueven la germinación de semillas (Hoang et al., 2013; Shu et al., 2016). Por otro lado, diferentes trabajos han demostrado que ethephon (ácido 2-chloroethylphosphonico) compuesto capaz de liberar etileno es activo en la ruptura de la dormición de semillas girasol (Corbineau et al., 2014). En girasol, la dormición de semillas es removida por la aplicación de etileno y otros tratamientos efectivos en la remoción de la dormición tales como methylviologen y cyanide (HCN) los cuales incrementan los niveles endógenos de etileno (Oracz et al., 2008; 2009; El-Maarouf-Bouteau et al., 2015). En concordancia con nuestros resultados Domínguez et al. (2016) observaron que Tifón (un compuesto liberador de etileno) o GA₃ son tratamientos efectivos en la liberación de la dormición de semillas de girasol. Es de destacar que los efectos de GA₃ y Ethephon en la ruptura de la dormición fueron superiores en semillas de la línea Xi3. Esto podría sugerir diferencias en la sensibilidad de las semillas a estos tratamientos exógenos.

Los procesos involucrados en la ruptura de la dormición y la regulación de la germinación se asocian con modificaciones significativas en el perfil hormonal de los tejidos que constituyen la semilla (Ribeiro et al., 2015; Andrade et al., 2015).

Los tratamientos exógenos +GA₃ y +Ethephon rompieron la dormición en semillas Xi3, sin embargo, no modificaron los niveles endógenos de ABA en eje embrionario respecto a la condición control durante la imbibición temprana.

Actualmente, es ampliamente aceptado que no solo los niveles endógenos de ABA y GAs sino también la relación ABA/GAs constituye un mecanismo regulatorio central en el mantenimiento y liberación de la dormición (Shu et al., 2016; Finch-Savage y Footitt, 2017). En eje embrionario de Xi3 la relación ABA/GA₁ disminuye en gran proporción a las 12 h de imbibición en semillas tratadas con GA₃ y Ethephon (datos no mostrados).

Por otro lado, una disminución en los niveles endógenos de ABA fue registrada en eje embrionario de semillas control y tratados a partir de las 3 h de imbibición respecto de la semilla seca. Similarmente, Xia et al. (2018) observaron que en eje embrionario de semillas de girasol del cultivar LG5665 (con dormición a cosecha) ABA disminuye hasta las 15 h de imbibición. En efecto, la disminución de ABA durante la imbibición ha sido descrita en semillas de diferentes especies, lo cual no afecta estrictamente la germinación (Ali-Rachedi et al., 2004; Arc et al., 2013).

A las 12 h de imbibición deoxistrigol alcanzó niveles endógenos relativamente menores en eje embrionario tratados con GA₃ solo o combinado con Ethephon respecto a la condición control, lo cual sugiere que deoxiestrigol no debería superar un nivel umbral de aproximadamente 40.000 (pmol.g PS)⁻¹ para disparar la germinación; a través de la regulación de la relación ABA/GAs como ha sido demostrado en *Arabidopsis* (Toh et al., 2012).

Al analizar los niveles endógenos de CS, el incremento registrado a las 12 h imbibición en eje embrionario de Xi3 luego de la aplicación exógena de GA₃ y ethephon (solos o en forma combinada) indicaría la participación de CS en la germinación de las semillas de girasol. En este sentido, Nomura et al. (2007), reportaron que CS juega un papel importante durante la germinación y primeras etapas de crecimiento de semillas de guisante.

A partir de lo antes expuesto se puede concluir que ABA estaría relacionado con la imposición de la dormición debida al embrión, mientras que deoxiestrigol estaría implicado en la germinación de semillas de girasol, en su mayor medida aportado por el eje embrionario (Fig. 18).

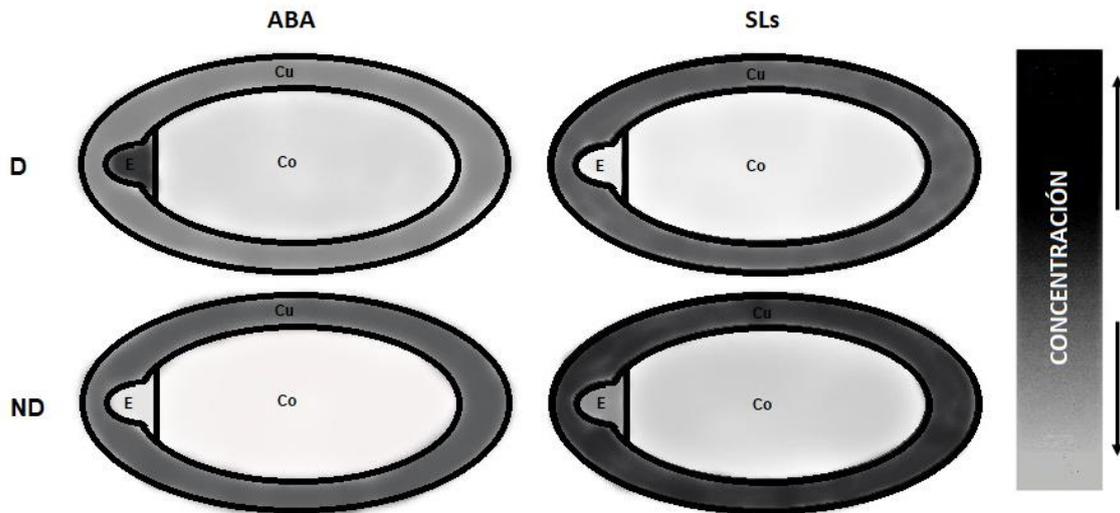


Fig. 18. Representación esquemática de los niveles endógenos de ABA y SLs en eje embrionario, cotiledones y cubiertas seminales de la semilla seca. E: Eje embrionario, Co: Cotiledones, Cu: Cubiertas seminales.

Los tratamientos más efectivos en la ruptura de la dormición, +GA₃ y +Ethephon solos o en forma combinada, modificaron diferencialmente los niveles hormonales endógenos durante la imbibición temprana permitiendo la germinación de las semillas. A fin de que la misma se desencadene es necesario que los niveles endógenos de ABA permanezcan bajos y CS y deoxiestrigol se incrementen en el eje embrionario durante la imbibición, no teniendo que alcanzar este último compuesto un nivel umbral de 40.000 (pmol.g PS)⁻¹. No obstante, estudios adicionales son necesarios a fin de dilucidar la participación de otras fitohormonas en la regulación de la germinación y dormición de semillas, como así también la modulación del transporte de ABA y GAs entre tejidos de la semilla.

CONCLUSIONES

- ✓ Semillas de girasol de las líneas endocriadas Xi3 y Xi3dm presentaron dormición a cosecha, mientras que semillas de la línea X274 fueron caracterizadas como no dormidas.
- ✓ Ácido abscísico estaría relacionado con la imposición de la dormición debida al embrión.
- ✓ Deoxiestrigol estaría implicado en la germinación de semillas de girasol.
- ✓ Los tratamientos más efectivos en la ruptura de la dormición de semillas de girasol fueron GA₃ y ethephon, solos o combinados.
- ✓ El perfil hormonal del eje embrionario fue diferencialmente modificado por la aplicación de tratamientos exógenos de reguladores del crecimiento efectivos en la ruptura de la dormición.
- ✓ Es necesario que los niveles endógenos de ABA permanezcan bajos y CS y deoxiestrigol se incrementen en el eje embrionario durante la imbibición, no teniendo que alcanzar este último compuesto un nivel umbral determinado, a fin de que la germinación de semillas de girasol se desencadene.

BIBLIOGRAFÍA

Adams RP y AK TeBeest. 2016. The effects of gibberellic acid (GA₃), Ethrel, seed soaking and pre-treatment storage temperatures on seed germination of *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. *Phytologia* 98: 213-218.

Aguirrezábal LAN, GA Orioli, LF Hernández, VR Pereyra y JP Miravé. 1996. La implantación del cultivo. En: Girasol Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento, pp 16.

Ali-Rachedi S, D Bouinot, MH 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 Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 219: 479-88.

Andrade A, N Riera, L Lindström, S Alemano, D Alvarez, G Abdala y A Vigliocco. 2015. Pericarp anatomy and hormone profiles of cypselas in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. *Plant Biol*. 17: 351-360.

Añon MC. 2016. Análisis tecnológicos y prospectivos sectoriales análisis tecnológicos. Complejo oleaginoso soja-girasol. Secretaria de Planeamiento y Políticas. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.

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. *Front Plant Sci*. 4: 63.

ASAGIR. 2018. Avanza el Proyecto Brechas. <http://www.asagir.org.ar>. Consultado: 23.08.2018.

Baskin C y JM Baskin. 2014. Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego, pp 150-162.

Bassel GW. 2016. To grow or not to grow?. *Trends Plant Sci*. 21: 498-505.

Benech-Arnold RL, MV Rodríguez y D Batlla. 2013. Seed dormancy and agriculture, physiology. En: Sustainable Food Production. Christou P., Savin R., Costa-Pierce B.A., Misztal I., Whitelaw C.B.A. (Eds.) New York, NY: Springer, pp 1425-1435.

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.

Castaño FD. 2018. The sunflower crop in Argentina: past, present and potential future. *OCL*. 25.

Chung Y y S Choe. 2013. The Regulation of Brassinosteroid Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Crit Rev Plant Sci*. 32: 396-410.

Corbineau F, Q Xia, C Bailly y H El-Maarouf-Bouteau. 2014. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front Plant Sci*. 10: 539.

Di Rienzo JA, F Casanoves, MG Balzarini, L Gonzalez y M Tablada. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Domínguez CP, D Batlla, MV Rodríguez, LB Windauer, M Gerbaldo y RL Benech-Arnold. 2016. Pericarp-imposed dormancy in sunflower: physiological basis, impact on crop emergence, and removal at an industrial scale. *Crop Sci*. 56: 716–726

Durgbanshi A, V Arbona, O Pozo, O Miersch, JV Sancho y A Gómez-Cadenas. 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*. 53: 8437-8442.

El-Maarouf-Bouteau H, Y Sajjad, J Bazin, N Langlade, SM Cristescu, S Balzergue, E Baudouin y C Bailly. 2015. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant Cell Environ.* 38: 364-374.

Finch-Savage WE y G Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.

Finch-Savage WE y S Footitt. 2017. Seed dormancy cycling and the regulation of dormancy mechanisms to time germination in variable field environments. *J. Exp. Bot.* 68: 843-856.

Finkelstein R, W Reeves, T Ariizumi y C Steber. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 387-415.

Hernández Silva E y I García-Martínez. 2016. Brasinoesteroides en la Agricultura. *Rev Mex De Cienc Agric.* 7: 441-450.

Hoang HH, C Bailly, F Corbineau y J Leymarie. 2013. Induction of secondary dormancy by hypoxia in barley grains and its hormonal regulation. *J Exp Bot.* 64.

Hu Y y D Yu. 2014. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 11: 4394-408.

Je BI, HL Piao , SJ Park , SH Park , CM Kim , YH Xuan , SH Park , J Huang, Y Do Choi , G An, HL Wong, S Fujioka, MC Kim, K Shimamoto y CD Han. 2010. RAV-Like1 maintains brassinosteroid homeostasis via the coordinated activation of BRI1 and biosynthetic genes in rice. *Plant Cell* 221: 1777-1791.

Khripach V, V Zhabinskii y A De Groot. 2000. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops

Liu H, N Trzaskalski y RJ Neil Emery. 2017. Analysis of Brassinosteroids in Soybean Seeds and Leaves by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Plant Sci. J.* 10: 100-109.

Maiti RK, P Vidyasagar, SC Shahapur y GJ Seiler. 2006. Studies on genotype variability and seed dormancy in sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.). *Indian J. Crop Sci.* 1: 84-87.

Mazorra LM y M Núñez. 2008. Estado Actual Sobre el Conocimiento de la Biosíntesis y los Mecanismos Moleculares de acción de los brasinoesteroides en las plantas. *Cultivos Tropicales.* 29: 91-105.

Miransari M y DL Smith. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99: 110-121.

Mishra S, S Upadhyay y RK Shukla. 2017. The Role of Strigolactones and Their Potential Cross-talk under Hostile Ecological Conditions in Plants. *Front Physiol.* 7:691.

Nasreen S, M Ayub Khan, Z Muhammad, I Mehwish, U Saleem, A Muhammad y F Zarrin. 2015. Response of sunflower to various pre-germination techniques for breaking seed dormancy. *Pak. J. Bot.* 47: 413-416.

Nomura T, U Masaaki, Y Yumiko, T Suguru, T Yasutomo y Y Takao. 2007. Roles of Brassinosteroids and Related mRNAs in Pea Seed Growth and Germination. *Plant Physiol.* 143: 1680-8.

Nonogaki H. 2014. Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Front Plant Sci.* 5: 233.

Oklestkova J, L Rárová, M Kvasnica y M Strnad. 2015. Brassinosteroids: synthesis and biological activities. *Phytochem Rev.* 14

Oracz K, H El-Maarouf-Bouteau, R Bogatek, F Corbineau y C Bailly. 2008. Release of sunflower seed dormancy by cyanide: cross-talk with ethylene signalling pathway. *J. Exp. Bot.* 59: 2241-2251.

Oracz K, H El-Maarouf-Bouteau, I Kranner, R. Bogatek, F. Corbineau y C Bailly. 2009. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key actors of cellular signalling during germination. *Plant Physiol.* 150: 494-505.

Penfield S. 2017. Seed dormancy and germination. *Curr. Biol.* 27: 874-878.

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.

Ribeiro LM, QS Garcia, M Müller y S Munne-Bosch. 2015. Tissue-specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. *Physiol. Plant.* 153: 627-642.

Roselló PL, AE Vigliocco, AM Andrade, NV Riera, M Calafat, ML Molas y SG Alemanno. 2016. Differential hormonal and gene expression dynamics in two inbred sunflower lines with contrasting dormancy level. *Plant Physiol Biochem.* 102:133-40.

Sah SJ, KR Reddy y J Li. 2016. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front. Plant Sci.* 7: 571.

Shu K, XD Liu, Q Xie y ZH He. 2016. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol. Plant.* 9: 34-45.

Skubacz A y A Daszkowska-Golec. 2017. Seed dormancy: The complex process regulated by abscisic acid, gibberellins and other phytohormones that makes seed germination work. En: *Phytohormones - Signaling mechanisms and crosstalk in plant development and stress responses.*

Toh S, Y Kamiya, N Kawakami, E Nambara, P McCourt y Y Tsuchiya. 2012. Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell Physiol.* 53: 107-117.

Xi W y H Yu. 2010. Mother of FT and TFL1 regulates seed germination and fertility relevant to the brassinosteroid signaling pathway. *Plant Signal Behav.* 5: 1315-1317.

Xia Q, M Ponnaia, F Gilard, F Perreau, S Huguet, S Balzergue, N Langlade, C Bailly, P Meimoun, F Corbineau y H El-Maarouf-Bouteau. 2018. One Way to Achieve Germination: Common Molecular Mechanism Induced by Ethylene and After-Ripening in Sunflower Seeds. *Int J Mol Sci.* 19.