



RIO CUARTO,

20 DIC. 2021

VISTO el proyecto de **ACUERDO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA** entre el **INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BOTANY AS CR (IEB)** de la República Checa y la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO**, representada por la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, y;

CONSIDERANDO:

Que las actividades de cooperación se desarrollan en el marco del proyecto de investigación PICT -2803/18(2020-2023). "Análisis integrado de perfiles bioquímicos, fisiológicos y moleculares en líneas endocriadas de girasol contrastantes en su nivel de dormancia y con potencial uso como estrategia para su remoción a nivel comercial", dirigido por el Prof. Dr. Sergio Alemanno, docente investigador del Departamento de Ciencias Naturales de esta Facultad. Dicho proyecto es financiado por AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN, EL DESARROLLO TECNOLÓGICO Y LA INNOVACIÓN, del MINISTERIO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN de la República Argentina

Que el propósito del presente acuerdo es establecer un marco para las actividades de cooperación que el IEB lleva adelante con el grupo de investigación del doctor Sergio ALEMANO, en referencia al mencionado Proyecto.

Que el mismo tiene como objetivo general, estudiar las bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares de la dormición impuesta por los diferentes tejidos que constituyen la semilla, en líneas puras de girasol con diferentes niveles de dormición al momento de cosecha.

Que tales investigaciones aportarán conocimientos acerca de los mecanismos que regulan la germinación y dormición de semillas, brindando de este modo información que podrá ser utilizada como herramienta para el abordaje de nuevas tecnologías tendientes a aportar soluciones a las dificultades asociadas a la dormición de semillas de girasol.

Que quienes firmarán el acuerdo serán el Rector Prof. Roberto Rovere de la UNRC, la Decana Dra. Marisa Rovera, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales y el Director del IEB, Dr. Martin Vágner.

Que se cuenta con el dictamen favorable de la Dirección de Asuntos Jurídicos Nro. 8973, y que el presente Acuerdo deberá ser autorizado por el Consejo Superior.

Que se cuenta con el Aval del Departamento de Ciencias Naturales, y el análisis por parte de la Unidad de Vinculación Tecnológica de la Secretaría de Extensión y Desarrollo de la UNRC.



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

Que el mismo cumple con los requisitos establecidos en las Reglamentaciones vigentes.

Que el mencionado Acuerdo se trató sobre tablas en reunión ordinaria de Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, el día 16 de diciembre del corriente año.

Por ello y en uso de las atribuciones conferidas por el Artículo 32 del Estatuto de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

**EL CONSEJO DIRECTIVO
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
RESUELVE:**

ARTICULO 1.- Aprobar el **ACUERDO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA** entre el **INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BOTANY AS CR (IEB)** de la República Checa y la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO**, representada por la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, según se detalla en ANEXO de la presente resolución.

ARTICULO 2.- Elevar la presente Resolución al **CONSEJO SUPERIOR** para su tratamiento.

ARTÍCULO 3.- Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento las Áreas de competencia. Cumplido, archívese.

DADA EN LA SALA DE SESIONES DEL CONSEJO DIRECTIVO DE ESTA FACULTAD, A LOS DIECISEIS DIAS DEL MES DE DICIEMBRE DEL AÑO DOS MIL VEINTIUNO.

RESOLUCION Nro.:

256

Dra. MARÍA MARTA REYNOSO
Sec. Académica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.

Dra. MARISA ROVERA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.



200

2021 - "AÑO DE HOMENAJE AL PREMIO NOBEL DE MEDICINA DR. CÉSAR MILSTEIN"

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

ANEXO

ACUERDO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA

Entre:

INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BOTANY AS CR, v.v.i. con domicilio: Rozvojová 263, 165 02 Prague 6 - Lysolaje, Czech Republic. Director: RN Dr. Martin Vágner, CSc. IC: 61389030, (en adelante, **IEB**)

Y

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO, (UNRC), representada por el Sr. Rector, Prof. Roberto Rovere, la **FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES**, representada por su Decana: Dra. Marisa Rovera (en adelante, **LA FACULTAD**), ambas con domicilio en Ruta 36, km 601 de la ciudad de Río Cuarto, República Argentina.

En lo sucesivo, individualmente, como Parte o conjuntamente como Partes.

Mientras que

IEB realiza investigación básica en biología molecular vegetal, fisiología, patología y biotecnología,

LA FACULTAD realiza investigación básica en biología de sistemas vegetales y latencia,

Las PARTES desarrollan actividades de cooperación en el marco del PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PICT-2803/18 (2020/2023), (en adelante **EL PROYECTO**), "Análisis integrado de perfiles bioquímicos, fisiológicos y moleculares en líneas endocriadas de girasol contrastantes en su nivel de dormición y con potencial uso como estrategia para su remoción a nivel comercial." dirigido por el Prof. Dr. Sergio Alemano, Departamento de Ciencias Naturales de LA FACULTAD, de la República Argentina. Este proyecto es financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica dependiente del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la República Argentina.

POR LO TANTO, en consideración de las premisas antes mencionadas, las PARTES acuerdan lo siguiente:

ARTÍCULO 1 - ALCANCE DEL ACUERDO

- 1.1 Ambas Partes se comprometen a hacer todos los esfuerzos razonables y diligentes para llevar a cabo EL PROYECTO. EL PROYECTO se describe más ampliamente en el Anexo 1 del presente Acuerdo.
- 1.2 La dirección, gestión e implementación de este Acuerdo serán acordadas por el Prof. Dr. Sergio Alemano (en nombre de LA FACULTAD, coordinador) y el Prof. Miroslav Strnad (en nombre del IEB, subcoordinador). Los siguientes científicos del IEB participarán en este proyecto: Dr. K Doležal (preparación de estándares de fitohormonas), Dr. D. Tarkowská (análisis de brasinoesteroides), Dr. J. Pospíšil (preparaciones de estrigolactona) y Dr. O. Novák (análisis de estrigolactona).
- 1.3 Las Partes, en general, se mantendrán informadas mutuamente de los resultados del trabajo realizado en relación con EL PROYECTO, a través de sus respectivos Investigadores Principales. Además, los respectivos Investigadores Principales de las Partes se consultarán entre sí sobre el progreso del PROYECTO de manera regular.

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

1.4 Durante el transcurso de EL PROYECTO, uno o ambos Investigadores Principales pueden encontrar ventajoso modificar EL PROYECTO. Cualquier modificación será documentada y formalizada en una enmienda escrita a este Acuerdo y dicha enmienda entrará en vigencia solo si está firmada por un representante autorizado de ambas Partes de este Acuerdo.

1.5 Nada en este Acuerdo puede interpretarse como una limitación de la libertad de ambas Partes o de sus investigadores que participen de este Acuerdo, de participar en investigaciones similares realizadas en virtud de otras subvenciones, contratos o acuerdos de investigación con otras Partes.

ARTÍCULO 2 - GASTOS

2.1 Cada Parte cubrirá sus propios gastos relacionados con la ejecución de este Acuerdo.

2.2 Ambas Partes harán esfuerzos para obtener más subvenciones para sus actividades comunes en virtud del presente a través de nuevos proyectos científicos conjuntos.

ARTÍCULO 3 - PROPIEDAD INTELECTUAL

3.1 Todos los derechos y títulos de las invenciones realizadas bajo el alcance de este Acuerdo únicamente por el personal de LA FACULTAD pertenecerán exclusivamente a LA FACULTAD.

3.2 Todos los derechos y títulos de las invenciones realizadas bajo el alcance del Acuerdo únicamente por el personal de IEB pertenecerán exclusivamente a IEB.

3.3 Sujeto a lo dispuesto anteriores, cuando los derechos y la titularidad de los resultados obtenidos por el personal del IEB actuando junto con el personal de LA FACULTAD bajo el alcance de este Acuerdo, sean compartidos por las PARTES en proporción a su contribución al resultado, se aplicará la siguiente disposición de los derechos del mismo:

- Las PARTES se prestarán toda la asistencia necesaria y trabajarán juntas en cooperación con respecto a la protección de tales invenciones conjuntas;
- La Patente, modelo de utilidad u otra Solicitud se presentará conjuntamente a nombre de LA FACULTAD e IEB, participando cada una de las PARTES en proporción a su contribución al resultado;
- Cuando corresponda, las PARTES acordarán el alcance territorial de la patente extranjera, modelo de utilidad u otra protección que las PARTES solicitarán;
- si una PARTE no desea participar en una patente extranjera, modelo de utilidad u otra protección en cierto territorio, la otra PARTE puede presentar una solicitud en dicho territorio en su propio nombre y por su cuenta.

3.4 Los detalles del acuerdo antes mencionado, así como el financiamiento de la patente, modelo de utilidad u otra protección solicitada y otorgada de conformidad con el Artículo 3.3 anterior, se acordarán en un Acuerdo Conjunto de Patentes que se negociará de buena fe con el objetivo de celebrarlo entre las PARTES para cada Patente conjunta o modelo de utilidad u otra Solicitud, antes de su presentación.

ARTÍCULO 4 - CONFIDENCIALIDAD

Las PARTES se comprometen a no divulgar la información resultante del presente Acuerdo o de su implementación y se comprometen a adoptar todas las medidas necesarias para que dicha información no sea divulgada, siendo responsables de las actuaciones de su personal dependiente y / o contratado para tal fin e



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

implementarán, en relación con la información confidencial, las medidas y formas que estimen convenientes respecto de aquellas.

La confidencialidad regirá durante la vigencia de este Acuerdo y durante los cinco (5) años posteriores. Para ello, las PARTES deberán contar con autorización escrita para transmitir dicha información, salvo la que sea requerida por autoridad pública debidamente fundada.

ARTÍCULO 5 - FUERZA MAYOR

Si el cumplimiento por alguna de las Partes de cualquiera de sus obligaciones en virtud de este Acuerdo se retrasa o impide por circunstancias fuera de su control razonable, debidamente justificado, esa Parte no incurrirá en incumplimiento de este Acuerdo debido a dicha demora en el cumplimiento. Sin embargo, si el retraso en el cumplimiento es de más de 3 (tres) meses, la otra Parte puede rescindir este Acuerdo con efecto inmediato mediante notificación por escrito a la otra Parte.

ARTÍCULO 6 - VIGENCIA DEL ACUERDO

6.1 Este Acuerdo será válido por la duración de EL PROYECTO en virtud de este Acuerdo.

6.2 Este Acuerdo puede rescindirse prematuramente mediante un acuerdo escrito de las PARTES.

ARTÍCULO 7 - CONTROVERSIAS

Las PARTES se comprometen a resolver de manera directa y amistosa entre sí, los desacuerdos y discrepancias que puedan surgir en la planificación y ejecución del presente Acuerdo, y en caso de disputa judicial someterse a la jurisdicción de los Tribunales Federales de la ciudad de Río Cuarto, República Argentina, constituyendo domicilios legales los ya mencionados.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, se firman tres (3) copias en español y tres (3) copias en inglés, versiones que tienen igual validez jurídica, manteniéndose cada parte una copia en ambos idiomas, en el lugar y fecha señalados.

Por IEB

Por La FACULTAD

Por UNRC

Por RN Dr. Martin Vágner, CSc.

Por Dra. Marisa Rovera

Por Prof. Roberto Robere

Función: DIRECTOR

Función: DECANA

Función: RECTOR

Firma

Firma

Firma

Fecha

Fecha

Fecha



Universidad Nacional de Rio Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

AGREEMENT ON SCIENTIFIC CO-OPERATION

Between:

INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BOTANY AS CR, v.v.i. with quarters: Rozvojová 263, 165 02 Prague 6 - Lysolaje, Czech Republic. Director: RNDr. Martin Vágner, CSc. IČ: 61389030, (hereinafter referred to as **IEB**)

And

NATIONAL UNIVERSITY OF RIO CUARTO (UNRC), represented by Sr. Rector, Prof. Roberto Rovere and the **FACULTY OF EXACT, PHYSICAL-CHEMICAL AND NATURAL SCIENCES**, represented by the Dean: Dra. Marisa Rovera (hereinafter referred to as **THE FACULTY**), addressed on Road 36, km 601 of Rio Cuarto city, Argentine Republic.

Hereinafter referred to individually as a Party or jointly as Parties.

Whereas

IEB performs basic research in plant molecular biology, physiology, pathology and biotechnology,

THE FACULTY performs basic research in plant systems biology and dormancy,

The PARTIES develop cooperation activities within the framework of RESEARCH PROJECT PICT-2803/18 (2020/2023), (hereinafter referred to as **THE PROYECT**), "Analysis of biochemical, physiological and molecular profiles in inbred sunflower lines contrasting in their level of latency and with potential use as a strategy for their removal at a commercial level" *"Integrated analysis of biochemical, physiological and molecular profiles in inbred sunflower lines contrasting in their level of latency and with potential use as a strategy for their removal at a commercial level"* directed by Prof. Dr. Sergio Alemano, Department of Natural Sciences of THE FACULTY, of the Argentine Republic. This project is financed by the National Agency for Scientific and Technological Promotion under the Ministry of Science, Technology and Innovation of the Argentine Republic.

NOW THEREFORE in consideration of above-mentioned premises the PARTIES agree as follows:



ARTICLE 1 - SCOPE OF THE AGREEMENT

1.1 Both Parties undertake to use their reasonable endeavours and diligent efforts to carry out **THE PROYECT. THE PROYECT** is described more extensively in Annex 1 hereto.

1.2 The direction, management and implementation of this Agreement will be agreed upon by Prof. Dr. Sergio Alemano (on behalf of THE FACULTY, coordinator) and Prof. Miroslav Strnad (on behalf of IEB, sub-coordinator). Following IEB scientist will be involved in this project: Dr. K Doležal (preparation of phytohormone standards), Dr. D. Tarkowská (brassinosteroid analyses), Dr. J. Pospíšil (strigolactone preparations) a Dr. O. Novák (strigolactone analyses).

1.3 The Parties shall generally keep one another informed of the Results of the work performed in connection with THE PROYECT, through their respective Principal Investigators. In addition, the Parties' respective Principal Investigators shall consult each other on the progress of THE PROYECT on a regular basis.

1.4 During the course of THE PROYECT, either or both of the Principal Investigators may find it advantageous to modify THE PROYECT. Any modifications will be documented and formalised in a written amendment to this Agreement and any such amendment will become effective only if signed by an authorised representative of both Parties to this Agreement.

1.5 Nothing in this Agreement may be construed to limit the freedom of both Parties or their researchers who are participants under this Agreement, from engaging in similar research made under other grants, contracts, or research agreements with other Parties.

ARTICLE 2 – EXPENSES

2.1 Each Party will cover its own expenses related to the performance of this Agreement.

2.2 Both Parties will make efforts to acquire further grant support of their common activities hereunder through new joint scientific projects.

ARTICLE 3 – INTELLECTUAL PROPERTY

3.1 All rights and title to inventions made under the scope of this Agreement...



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

3.2 All rights and title to inventions made under the scope of the Agreement solely by personnel of IEB shall belong solely to IEB.

3.3 Subject to the provisions above, where rights and title to results made by personnel of IEB acting together with personnel of THE FACULTY under the scope of this Agreement will be shared by PARTIES in proportion of their contribution to the result, the following arrangement of the rights thereof shall apply:

- The PARTIES shall provide to each other every assistance and shall work together co-operatively in respect of the protection of such joint inventions;
- The Patent, utility model or other Application shall be filed jointly in the names of THE FACULTY and IEB, each of the PARTIES having a share in proportion to its contribution to the result;
- Where applicable PARTIES will agree on the territorial scope of foreign patent, utility model or other protection for which the PARTIES will apply;
- if a PARTY does not wish to participate on foreign patent, utility model or other protection in certain territory, the other PARTY may file an application in such territory in its own name and at its own cost.

3.4 Details of the above mentioned arrangement as well as financing of patent, utility model or other protection applied for and granted pursuant to Article 3.3 above and will be agreed in a Joint Patent Agreement which will be negotiated in good faith with the aim of conclusion between the PARTIES for every joint Patent or utility model or other Application, prior to its filing.

ARTICLE 4 – CONFIDENTIALITY

The PARTIES undertake not to disclose the information resulting from this agreement or its implementation and undertake to adopt all necessary measures so that such information is not disclosed, being responsible for the actions of their dependent personnel and / or contracted for this purpose and will implement in relation to confidential information the measures and forms that they deem appropriate with respect to those.

Confidentiality will govern for the duration of this Agreement and for five (5) years after it. For this, the PARTIES must have written authorization to transmit that information, except that which is required by duly founded public authority.



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

If the performance by either Party of any of its obligations under this Agreement is delayed or prevented by circumstances beyond its reasonable control, duly justified, that Party will not be in breach of this Agreement due to such delay in performance. However, if the delay in performance is more than 3 (three) months, the other Party may terminate this Agreement with immediate effect by notifying the other Party in writing.

ARTICLE 6 – TERM OF THE AGREEMENT

6.1 This Agreement shall be valid for the length of THE PROYECT under this Agreement.

6.2 This Agreement can be prematurely terminated by a written agreement of the PARTIES.

ARTICLE 7 – DISPUTES

The PARTIES undertake to resolve directly and amicably among themselves, the disagreements and discrepancies that may arise in the planning and execution of the protocol, and in the event of a judicial dispute submit to the jurisdiction of the Federal Courts of the city of Río Cuarto, Argentine Republic, constituting legal domiciles those already mentioned.

IN WITNESS WHEREOF, three (3) copies in Spanish and three (3) copies in English are signed, versions that have equal juridical validity, keeping each party one copy in both languages, in the place and date stated.

For IEB

For THE FACULTY

For THE UNIVERSITY

By RNDr. Martin Vágner, CSc.

By Dra. Marisa Rovera

By Prof. Roberto Rovere

Function: DIRECTOR

Function: DEAN

Function: RECTOR

Signature

Signature

Signature

Date

Date



Análisis integrado de perfiles bioquímicos, fisiológicos y moleculares en líneas endocriadas de girasol contrastantes en su nivel de dormición y con potencial uso como estrategia para su remoción a nivel comercial.

CARATULA DE PROYECTO

Convocatoria

Proyecto	PICT-II-A-2018
Categoría	Argentina Innovadora
Tipo	Equipos de Trabajo

Datos generales del proyecto

Áreas temáticas	Tecnología Agraria y Forestal
Prioridad regional	AGROINDUSTRIA
Duración	3
Ubicación	Córdoba
Investigador responsable	ALEMANO, SERGIO (20175767984)
Fecha de envío	12 Sep 2018 - 12:11

Instituciones del proyecto

Institución Beneficiaria	Universidad Nacional de Río Cuarto [UNRC]
Representante Legal	Roberto Rovere Tel: (0358) 467-6200 Email: secpriv@rec.unrc.edu.ar
Firma y aclaración	
Dependencia	Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Químicas y Naturales [Dpto. Ciencias N] Tel: - Email: -
Unidad Ejecutora	Laboratorio de Fisiología Vegetal [LABFV] Tel: (0291) 456-6130 - 459-5127 Email: ficurvet@criba.edu.ar

Presupuesto

Rubro	Subsidio (\$)	Contraparte
Personal (Salarios)	0,00	1934400,00
Insumos	395000,00	0,00
Viajes y viáticos	320000,00	0,00
Equipamiento	325000,00	0,00
Bibliografía	10000,00	0,00
Publicaciones de resultado del proyecto	70000,00	0,00
Gastos de servicios técnicos especializados	50000,00	0,00
Total	1170000,00	1934400,00

Becas

Tipo	Descripción
Tipo de la Beca	

Conformación del Grupo Responsable

Nombre	Apellido	Rol	Firma
ANA EDIT	VIGLIOCCO	Investigador Integrante	
ANDREA MARIELA	ANDRADE	Investigador Integrante	

Conformación del Grupo Colaborador

Nombre	Apellido	Rol	Firma
DIEGO	BATILA		



MARÍA VERÓNICA	RODRÍGUEZ	Investigador
MARIA VERONICA	PEREZ CHACA	Investigador
DANIEL	ALVAREZ	Investigador
Milosev	Strnad	Investigador extranjero en el exterior
Marisa	Dellamaddalena	Investigador
Maximiliano Raul	Escalante	Investigador
Oscar Alberto	Masciarelli	Personal Técnico
Mariela Rosana	Woelke	Personal Técnico
Zoé	Del Bel	Estudiante

Empresas Adoptantes

Empresa Adoptante

Firma y aclaración

Aplica solamente a líneas PID y PID-C
Teléfono: Email:

1. OBJETIVOS GENERALES

Las demandas actuales y futuras de alimentos y bioenergía, en el contexto de crecimiento demográfico, cambio climático global y la escasa o nula posibilidad de incrementar la superficie cultivable; desafían a incrementar los rendimientos potenciales de los cultivos, pero fundamentalmente reducir las brechas entre los rendimientos potenciales con respecto a los alcanzados. La germinación de semillas es uno de los principales factores que afectan la producción en los sistemas productivos. En este sentido, la calidad de las semillas utilizadas por los productores es uno de los aspectos más importante a tener en cuenta dentro de la rentabilidad de la producción agropecuaria, debido a que la productividad de cultivos se incrementa con el uso de semillas de alta calidad entre otros factores (Agrawal, 2011). Así, un aspecto importante a tener en cuenta por los criaderos de semillas es proporcionar semillas de alta calidad y en cantidad suficiente en el momento y lugar demandado por el productor. Entre los factores que afectan la germinación, la dormición es probablemente la más importante, ya que es un rasgo hereditario que puede inhibir la germinación de una semilla viable (Rodríguez et al., 2011). Tanto agricultores, como criaderos de semillas encuentran problemas asociados a dormición, lo que puede resultar en pérdidas económicas graves. La modificación de la dormición de la semilla debe ocurrir en un "intervalo de tiempo preciso", lo cual no se puede lograr sin un conocimiento sólido de los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en la germinación y dormición de semillas. El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un importante cultivo agrícola que debido a la calidad de su aceite es útil para el consumo humano y la producción de biodiesel (Paniego et al., 2007). Sin embargo, este cultivo presenta dormición y variabilidad en la germinación de sus semillas, lo cual genera problemas en los criaderos con aquellas semillas que son producidas en contra-estación en el Norte de nuestro país o en otros países, las que deben ser seleccionada, clasificadas y entregadas al productor de la zona pampeana en un período de tiempo relativamente corto, generando dificultades en su comercialización y retraso en la siembra inmediata y (Maiti et al., 2006; Vujaković et al., 2012) con las consiguientes pérdidas económicas. En este sentido, el estudio de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares implicados en la ruptura de la dormición y promoción de la germinación permitirá predecir, al menos en parte, el potencial comportamiento del cultivo a campo durante las etapas de germinación y crecimiento temprano, como así también contribuirá al desarrollo de nuevas tecnologías de control de la dormición, requisito esencial para lograr disminuir su incidencia en situaciones productivas. Este proyecto tiene como **objetivo general** estudiar las bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares de la dormición impuesta por los diferentes tejidos que constituyen la semilla, en líneas puras de girasol con diferentes niveles de dormición al momento de cosecha. Particularmente se propone estudiar el rol de nuevos "actores químicos" -brasinoesteroides, estrigolactonas y karriquinas- en la germinación y la dormición de semillas de girasol de líneas endocriadas contrastantes en su capacidad germinativa; analizando su interacción hormonal, bioquímica y de expresión génica. Tales investigaciones aportarán conocimientos acerca de los mecanismos que regulan la germinación y dormición de semillas, brindando de este modo información que podrá ser utilizada como herramienta para el abordaje de nuevas tecnologías tendientes a aportar soluciones a las dificultades asociadas a la dormición de semillas de girasol.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

A fin de estudiar las bases fisiológicas y moleculares de la dormición en semillas de girasol, se proponen las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis 1: "Semillas de girasol con diferente nivel de dormición al momento de cosecha presentan diferencias en los niveles endógenos de brasinoesteroides y estrigolactonas". En el **primer objetivo específico** se propone cuantificar los niveles endógenos de brasinoesteroides (BRs) y estrigolactonas (SLs) en eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo de semillas secas y

embebidas de las líneas de girasol líneas B91 (sin dormición a cosecha), B123 (con bajo nivel de dormición a cosecha) y A-3 (con alto nivel de dormición a cosecha).

Hipótesis 2: “Diferentes niveles de dormición en semillas de girasol al momento de cosecha presentan diferencias en la expresión de genes involucrados en el metabolismo (biosíntesis y/o catabolismo) de brasinoesteroides y estrigolactonas”. Para comprobar esta hipótesis se plantea como **segundo objetivo específico** estudiar la expresión de genes que participan en el metabolismo de tales hormonas: *LK (esterol 5 α -reductasa)*, *CYP85A1 (C6-oxidasa)*, *CCD7* y *CCD8 (dioxigenasas 7 y 8)* en eje embrionario de semillas secas y embebidas de las líneas de girasol B91, B123 y A-3.

Hipótesis 3: “Modificaciones en el contenido endógeno de brasinoesteroides y estrigolactonas en eje embrionario, están asociados con cambios en el nivel de expresión de genes involucrados en el metabolismo de dichas hormonas”. Como **tercer objetivo específico** se pretende correlacionar el contenido endógeno de brasinoesteroides y estrigolactonas en eje embrionario de semillas secas y embebidas con la expresión de genes del metabolismo hormonal.

Hipótesis 4: “Brasinoesteroides, estrigolactonas y karriquinas regulan la germinación y dormición de semillas de girasol a través de la modulación de la biosíntesis y camino de señalización de ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GAs)”. En el **cuarto objetivo específico** se evaluará la acción de brasinoesteroides, estrigolactonas y karriquinas sobre la germinación y dormición de semillas de girasol a través de aplicaciones exógenas. Asimismo, se determinará la acción de estos compuestos sobre el contenido endógeno de ABA, sus catabolitos (ácido faseico, PA; dihidrofaseico, DPA y ABA-glucosil éster, ABA-GE) y GAs (GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇) y el nivel de expresión de genes (*ABI3*, *Abscisic acid insensitive 3* y *RGL2*, *RGA-like 2*) en eje embrionario de semillas secas y embebidas de las líneas de girasol B91, B123 y A-3.

Hipótesis 5: “Las especies reactivas de oxígeno (ROS) interaccionan con brasinoesteroides, estrigolactonas y karriquinas en la regulación de la germinación y dormición de semillas de girasol” El **quinto objetivo específico** consiste en evaluar el efecto de la aplicación exógena de BRs, SLs y KARs sobre el contenido endógeno de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y anión superóxido (O₂⁻) y la actividad de enzimas del sistema antioxidante como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) en eje embrionario de semillas secas y embebidas de las líneas de girasol B91, B123 y A-3.

Hipótesis 6: “Brasinoesteroides, estrigolactonas y karriquinas regulan la germinación y dormición de semillas de girasol a través de la modulación del transporte de ABA y GAs entre tejidos de la semilla”. En el **sexto objetivo específico** consiste en evaluar el efecto de la aplicación exógena de BRs, SLs y KARs sobre el nivel de expresión de los genes *ABCG30 (ATP-Binding Cassette G30)* y *NPF3 (Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter 3)*, involucrados en la síntesis de transportadores de ABA y GAs, en eje embrionario de semillas de las líneas de girasol B91, B123 y A-3.

3. RELEVANCIA DEL PROBLEMA

El cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.) ocupa en Argentina una importante superficie; 1,9 x 10⁶ ha en la campaña 2017-2018, con una producción de 3,5 x 10⁶ tn. A su vez, el rinde medio en nacional se ubicó en la presente campaña en 20,7 qq/ha, superando en un 4 % al promedio de los últimos cinco años y en 0,4 qq/ha al acumulado durante el ciclo 2016/17 (Bolsa de Cereales de Bs. As., 2018). Las predicciones internacionales sugieren un aumento en la demanda del aceite de girasol y subproductos; por lo que los agricultores argentinos podrían hacer una gran contribución a fin de satisfacer estas necesidades. A partir de las promisorias expectativas del cultivo de girasol se espera un significativo

incremento del área sembrada en Argentina (Castaño, 2018), como la reducción de las “brechas de rendimiento”, meta propuesta por la Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR, 2018). Este hecho, implica obtener una adecuada implantación y establecimiento del cultivo, lo cual impactará en uno de los componentes clave de su rendimiento como es el número de plantas/ha, y por ende el número de capítulos por unidad de superficie, para lo cual es necesario disponer de semillas de calidad que puedan germinar rápidamente y en forma uniforme.

Actualmente, se han detectado en el cultivo de girasol diferentes problemas productivos entre los cuales se encuentra la dormición en sus semillas al momento de cosecha (Rodríguez et al., 2011); a partir de la cual las semillas son incapaces de germinar debido a mecanismos internos, -de naturaleza física, morfológica y/o fisiológica-, que bloquean la germinación aun cuando todas las condiciones ambientales son favorables para que ello ocurra (Koornneef et al., 2002). Esto genera problemas en líneas fundacionales e híbridos producidos en los criaderos de semillas, lo cual de no resolverse producirá dificultades en la siembra del cultivo. No debemos olvidar que las semillas utilizadas en siembras de la zona pampeana provienen de cultivos realizados en contra-estación en zonas más cálidas del país o del exterior, y con ello los tiempos entre su cosecha, posterior proceso de selección en los criaderos y liberación comercial para su posterior siembra son acotados. En girasol, la dormición está controlada tanto por el embrión como por las cubiertas de la semilla (testa y pericarpo) 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 pericarpo persiste generalmente por más de 32 semanas (Brunick, 2007). En cuanto a la persistencia de la dormición en semillas de girasol, la misma también 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., 2005), inclusive un mismo genotipo presenta variabilidad de acuerdo a su origen (condición agro-ecológica) (Benech-Arnold et al., 2013).

La germinación y dormición de semillas son procesos regulados por la acción simultánea de diferentes fitohormonas a través de interacciones sinérgicas y antagónicas entre ellas. Las respuestas mediadas por hormonas en semillas están reguladas principalmente por su metabolismo - biosíntesis y catabolismo- y/o el camino de transducción de su señal (Shu et al., 2016; Skubacz y Daszkowska-Golec, 2017). Recientemente, se ha propuesto que el transporte de hormonas y sus precursores entre los diferentes tejidos que constituyen una semilla también jugaría un rol en las respuestas hormonales (Nonogaki, 2017). Es ampliamente conocido que ácido abscísico (ABA, promueve la dormición de semillas) y giberelinas (GAs, estimulan la germinación de semillas) son las hormonas primarias que juegan un rol antagónico en la regulación de la germinación y dormición de semillas (Shu et al., 2016; Vishal y Kumar; 2018); especialmente importante es el balance entre ambas. Es más, tanto ABA como GAs interactúan a nivel de su biosíntesis y vías de señalización (Graeber et al., 2012; Gazzarrini y Tsai 2015). Más aún, su acción puede ser modulada por otras fitohormonas tales como auxinas, jasmonatos (JAs), etileno (ET), ácido salicílico (SA) entre otras (Shu et al., 2016; Skubacz y Daszkowska-Golec, 2017). Por otra parte, se ha demostrado que nuevos “actores químicos” entre las fitohormonas también contribuyen en la regulación de la germinación y dormición de semillas; entre ellas brasinosteroides (BRs) y estrigolactonas (SLs). Los BRs antagonizan la acción de ABA en la regulación de la dormición y germinación de semillas (Steber y McCourt, 2001). En tal sentido, ha sido reportado que el efecto antagónico de BRs en relación a ABA está mediado por el gen *MADRE DE FT Y TFL1 (MFT)* el cual modula negativamente el camino de señalización de ABA (Xi et al., 2010). En mutantes BRs-deficientes y BRs- insensibles la germinación es fuertemente inhibida por ABA en comparación con el fenotipo salvaje; confirmando el rol de los BRs en el proceso de germinación (Steber y McCourt, 2001). Asimismo, se ha demostrado que BIN2 (Brassinosteroid Insensitive 2), un represor clave de la vía de señalización de BRs, fosforila y estabiliza la proteína ABI5 que media el camino de señalización de ABA durante la germinación; así los BRs reprimen la interacción BIN2-ABI5 (Hu y Yu, 2014). Por otro lado, Chitnis et al. (2014) observaron en semillas de trigo que el “after-ripening” activa la biosíntesis y camino de señalización de BRs durante la imbibición contrarrestando el accionar de ABA. En relación a la interacción BRs-GAs, diferentes

estudios han demostrado que los BRs puede revertir el fenotipo de semillas no germinantes de *Arabidopsis* deficientes o insensibles a GAs (Steber y McCourt, 2001). Es más, BRs, GAs y ET incrementan la germinación de las semillas debido a su rol en la ruptura del endosperma (FinchSavage y Leubner-Metzger, 2006). Respecto a las SLs, fueron descritas por primera vez como moléculas señales involucradas en la estimulación de la germinación de semillas de plantas parásitas del género *Striga* y *Orobancha* (Bouwmeester et al., 2003). Recientemente, las SLs han sido implicadas en activación de la germinación en otras especies (Toh et al., 2012; Shu et al., 2016). Toh et al. (2012) reportaron que las SLs aliviarían la termoinhibición en semillas de *Arabidopsis* a través de la modulación de la relación ABA/GAs. Además, algunos componentes clave de su vía de señalización afectan la germinación de las semillas, tales como *SMAX1* (*Suppressor of More Axillary Growth2 1*) en *Arabidopsis* (Stanga et al., 2013) y *OsD53* (Jiang et al., 2013) en arroz. A nivel molecular, la mayoría de las modificaciones bioquímicas y fisiológicas que ocurren durante la germinación y dormición de semillas están regidas por la expresión de diversos grupos de genes (Weitbrecht et al., 2011). Es más, ha sido demostrado que en ciertas especies tales como *Nicotina tabacum* (Leubner-Metzger, 2005), *Nicotiana plumbaginifolia* (Bove et al., 2005) y cebada (Leymarie et al., 2007) el "after-ripening" gatilla cambios en la expresión génica. En este sentido, recientemente Chitnis et al. (2014) observó cambios en la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis y camino de señalización de BRs, ET, SA y citocininas en semillas secas y embebidas de trigo luego del almacenamiento en seco. De hecho, cambios en la expresión de genes que codifican enzimas del metabolismo hormonal son considerados los principales reguladores genéticos de la germinación y dormición de semillas.

En adición a las fitohormonas, otros compuestos químicos tienen la capacidad para regular la germinación y dormición de semillas, entre ellos las karrikinas (KARs) (Dixon et al., 2009) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Oracz y Karpinski, 2016). Diferentes estudios revelaron que las KARs promueven la germinación y establecimiento de plántulas en *Arabidopsis* (Waters et al., 2014; Flematti et al., 2015); mientras que otras investigaciones determinaron que semillas de cultivos hortícolas tales como lechuga (*Lactuca saliva*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) fueron capaces de responder a KARs (Jain et al., 2006; Stevens et al., 2007). Más aún, recientemente Meng et al. (2016) demostraron que las KARs retrasan la germinación de semillas de soja a través de la modificación la relación ABA/GAs. En efecto, evidencias actuales muestran que las KARs regulan la germinación de semillas a través de la modulación de la biosíntesis y/o camino de transducción de ABA, GAs y ácido indol-3-acético (AIA) (Meng et al., 2017). Sin embargo, investigaciones futuras son necesarias para estudiar el rol de las KARs en la germinación de semillas de otros cultivos de interés agrícola. En relación a ROS, ha sido ampliamente documentado la existencia de una interacción entre ROS y fitohormonas, en diferentes procesos relacionados con la germinación y dormición de semillas (Bahin et al., 2011; Oracz y Karpinski 2016; Wojtyla et al., 2016). Particularmente, en semillas de girasol la pérdida de dormición está asociada con la acumulación de ROS, la peroxidación de lípidos y la carbonilación de proteínas específicas en células del eje embrionario (Oracz et al., 2007; Bailly et al., 2008). Más aún, El-Maarouf-Bouteau et al. (2015) proporcionó evidencia de la existencia de una estrecha interacción entre ROS, ABA y ET en la pérdida de dormición de semillas de girasol.

Respecto al transporte hormonal, diferentes tipos de transportadores han sido implicados en el transporte local y a larga distancia de hormonas vegetales (Park et al., 2017); sin embargo, menores son los conocimientos sobre los mecanismos del transporte de hormonas en los tejidos que constituyen la semilla (Nonogaki, 2017). Kang et al. (2015) localizaron exportadores de ABA - AtABCG31 y AtABCG25- en endosperma de semillas de *Arabidopsis*; mientras que los importadores -AtABCG30 y AtABCG40- se localizaron principalmente en el embrión, lo que sugiere que ABA producido en endosperma se transporta y tiene un rol en el embrión. Así estos autores, determinaron que el crecimiento embrionario es inhibido por la actividad coordinada de múltiples transportadores de ABA expresados en los diferentes tejidos de la semilla. En adición a los transportadores ABCGs, en semillas se han identificado los transportadores AIT1 (ABA-IMPORTING TRANSPORTER1)

también involucrados en el transporte de ABA. Semillas que sobreexpresan *AIT1* tiene mayor sensibilidad a ABA respecto del cultivar silvestres; mientras que semillas mutantes *ait1* son insensibles a ABA exógeno (Kanno et al., 2012). En cuanto al transporte de GAs, Tal et al. (2016) observaron que los transportadores tipo NPF3 localizados en membrana plasmática de células endodérmicas de raíces de *Arabidopsis*, podrían jugar un rol en el transporte de esta hormona en semillas (Nonogaki, 2017). Por otro lado, la expresión de *NPF3* en las raíces es reprimida por GAs y promovida por ABA; y ambas hormonas pueden ser transportadas por este tipo de transportador, por lo que la interacción ABA-GAs también podría ocurrir a nivel de transporte hormonal.

A partir de lo antes expuesto, se demuestra la complejidad del proceso de dormición que ocurre en semillas y con ello la necesidad de dilucidar la participación de nuevos "actores químicos" -BRs, SLs y KARs- en la regulación de la germinación y dormición de semillas de girasol y su probable interacción con hormonas primarias -ABA y GAs- y ROS. Estos conocimientos permitirán nuevos abordajes tecnológicos que posibilitarán minimizar el impacto de esta problemática en el cultivo de girasol.

4. RESULTADOS PRELIMINARES Y APORTES DEL GRUPO AL ESTUDIO DEL PROBLEMA EN CUESTIÓN

Entre los problemas que suele enfrentar la industria semillera en Argentina está la dormición de semillas de girasol, lo cual ocurre principalmente con aquellas semillas producidas en contra-estación. Esto afecta la germinación, generando problemas en el establecimiento y rendimiento del cultivo. Por este motivo, es que en los últimos años nuestro grupo de trabajo concentrara sus esfuerzos en el estudio de esta problemática, ya que la dormición de semillas afecta tanto a líneas endocriadas de girasol como a sus respectivos híbridos. Es más, el estudio de la germinación y dormición de semillas es un proceso biológico altamente intrigante y en consecuencia, mueve la curiosidad científica, más aun entendiendo que el estudio de los procesos fisiológicos y moleculares implicados en estos procesos puede tener fuertes implicaciones tecnológicas.

En un principio nuestros estudios caracterizaron el nivel de dormición al momento de cosecha dos líneas endocriadas de girasol, diferenciándose la línea B123 (con dormición a cosecha) y la línea B91 (sin dormición a cosecha). Luego del almacenamiento en seco a temperatura ambiente (25°C) por 33 días el porcentaje de germinación fue similar en ambas líneas, corroborando que este tratamiento es efectivo en la liberación de la dormición en semillas de girasol; tales como aquellas de la línea B123. Sin embargo, cuando las semillas de la línea B123 fueron conservadas a -20°C, el nivel de dormición se mantuvo (Andrade et al., 2015). El contenido de jasmonatos (JAs), ácido absísico (ABA), giberelina 1 (GA₁) y 3 (GA₃) se evaluó a los 0, 11, 22, 33 y 44 días post-cosecha en eje embrionario, cotiledones y pericarpo de semillas secas. En embrión (eje embrionario + cotiledones), ácido jasmónico (JA) no mostró diferencias entre ambas líneas y su contenido fue mayor a los 33 días post-cosecha, siendo este incremento más notorio en la línea B123. El contenido del derivado hidroxilado 12-hidroxi-jasmónico (12-OH-JA) fue fluctuante en ambas líneas durante todo el experimento. En pericarpo, el contenido de JA fue mayor en la línea B123 en todos los tiempos post-cosecha evaluados. Tanto en la línea B91 como B123, ácido jasmónico conjugado con isoleucina (JA-Ile) no varió significativamente entre los tiempos post-cosecha (Bohano, 2012, Tesis de grado). En cotiledones de la línea B123, el contenido de ABA alcanzó su pico máximo a los 22 días post-cosecha y luego decreció hacia el final del experimento. GA₁ mostró un incremento gradual en su contenido hasta los 22 días post-cosecha en la línea B123; mientras que en B91 se detectó mayor acumulación de GA₃ a los mismos tiempos. En eje embrionario, tanto en B91 como en B123, ABA no varió significativamente entre los tiempos post-cosecha analizados. El contenido de GA₃ incrementó considerablemente en ambas líneas a los 33 días post-cosecha. Por el contrario, en la línea B91, GA₁ mostró un contenido más elevado a los 0 y 22 días post-cosecha. En pericarpo el contenido de ABA se mantuvo estable hasta el final del experimento en ambas líneas (Kovacevich, 2012, Tesis de

grado). Posteriormente, nuestros estudios se centraron en el análisis de cambios fisiológicos, moleculares y bioquímicos que ocurren durante la imbibición temprana (entre las 0 y 24 h de imbibición). Los resultados mostraron que en pericarpo de semillas secas de las líneas B91 y B123 el contenido de ácido salicílico (SA) fue mayor a los 33 días post-cosecha (en ambas temperaturas de almacenamiento: 25°C y -20°C) respecto de los 0 días. Durante la imbibición, SA no mostró diferencias en pericarpo de semillas almacenadas por 33 días a 25°C y -20°C. El contenido de ABA no se modificó significativamente a partir de las 12 h de imbibición tanto a los 0 y 33 días de almacenamiento a bajas temperaturas. Respecto a los JAs, a los 0 días post-cosecha el contenido del ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) -precursor de JA- fue máximo en pericarpo de la línea B123; mientras que en B91 el pericarpo de semillas almacenadas por 33 días a bajas temperaturas mostró el máximo nivel. Por otro lado, el nivel endógeno de JA fue mayor en pericarpo de semillas recién cosechadas y almacenadas por 33 días a temperatura ambiente respecto del pericarpo de semillas almacenadas a bajas temperaturas. Estos hallazgos indicaron que el perfil hormonal del pericarpo varía según el nivel de dormición de la semilla y se modifica diferencialmente como resultado tanto del proceso de imbibición como del período de almacenamiento post-cosecha (Andrade et al., 2015). Por otro lado, investigamos el contenido endógeno de ABA, sus catabolitos y las giberelinas activas -GA₁ y GA₃-, así como el nivel de expresión de ciertos genes del metabolismo y del camino de señalización de dichas hormonas en embriones de semillas secas y embebidas. Los resultados mostraron que el contenido de ABA fue superior en embrión de semillas secas de la línea B123. Un pico de ABA fue registrado a las 3 h de imbibición en embrión de la línea B123, el cual fue acompañado por un descenso significativo en el contenido del conjugado de ABA con glucosa (ABA-GE) y de ácido fásico (PA). Sin embargo, y en referencia al proceso de de-conjugación no se observaron diferencias en los niveles de expresión de gen *β-Glucosidase* durante la imbibición entre ambas líneas, por lo se podría decir que el proceso de de-conjugación no es la principal fuente de ABA bioactivo requerido para el mantenimiento de la dormición en la línea B123. Sin embargo, una disminución en los niveles de ABA fue detectado a las 6 h de imbibición en embrión de B123, lo que se correlacionó con un incremento de PA y el gen *ABA-8'-OH (ABA-8'-hidroxilasa)*, por lo que el catabolismo de ABA podría ser gatillado durante la imbibición. Respecto a las GAs ambas líneas mostraron incremento en los niveles endógenos de las giberelinas activas -GA₁ y GA₃- a las 12 h de imbibición, lo que se correlacionó con un incremento en la expresión de los genes de la biosíntesis *GA3-ox* and *GA20-ox* a las 6 h de imbibición. A las 0 y 3 h de imbibición el gen *RGL2* (proteína DELLA, inhibitoria de la germinación) sólo estuvo presente en la línea B123. Así, la imposición y mantenimiento de la dormición de semillas B123 estarían en relación con la expresión del gen *RGL2* y la síntesis de "novo" de ABA durante la imbibición (Roselló et al., 2016). El análisis de OPDA y JA mostró diferencias entre eje embrionario y cotiledones de las líneas B123 y B91; observándose mayores niveles en eje embrionario. A los 0 días post-cosecha, el nivel de OPDA y JA fue menor en embriones (eje embrionario + cotiledones) de semillas secas B123 respecto de B91. En semillas secas de la línea B91 un nivel umbral -OPDA: 75000 pmol (g PS)⁻¹; JA: 50000 pmol (g PS)⁻¹- fue necesario para que la germinación se desencadenara. 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°C incrementó los niveles de ambos compuestos en eje embrionario de semillas secas y embebidas de la línea B123. De este modo, el perfil hormonal de OPDA y JA en eje embrionario y cotiledones fue diferencialmente modificado durante la imbibición y el almacenamiento en seco a temperatura ambiente. Más aún, JA y OPDA estarían involucrados en la liberación de la dormición mediada por el embrión en semillas B123 (Alcoba, Tesis de grado). Por otro lado, se investigó la interacción entre especies reactivas del oxígeno (ROS), enzimas del sistema antioxidante y SA durante la imbibición temprana de semillas de las líneas B123 y B91. Este análisis mostró que el embrión (eje embrionario + cotiledones) de semillas secas de la línea B123 presentó mayor nivel de SA respecto de B91. Una disminución en los niveles de SA fue observada en embrión de la línea B123 luego del almacenamiento en seco. Bajos niveles de H₂O₂ se detectaron en embriones de semillas secas de la

línea B123 al momento de cosecha, los que se incrementaron luego del almacenamiento en seco a temperatura ambiente, indicando que es necesario un nivel umbral más alto de H_2O_2 en semilla seca de esta línea para que la pérdida de dormición se desencadene. Una disminución de la actividad catalasa (CAT) se correlacionó con altos niveles de H_2O_2 en eje embrionario de semillas secas de la línea B123 almacenadas por 33 días a 25°C. Respecto a la actividad ascorbato peroxidasa (APX) no se registraron relevantes diferencias entre líneas. Durante la imbibición, un incremento de SA se registró a las 3 h de imbibición, el que se correlacionó con una disminución de H_2O_2 a las 6 h de imbibición en eje embrionario de semillas B123 almacenadas por 33 días; lo que podría sugerir que SA podría promover la eliminación de ROS durante la imbibición temprana, contribuyendo así a la regulación del nivel de H_2O_2 en la semilla. Estos resultados indicarían que SA participaría en la imposición de la dormición en semillas de girasol; además de confirmar la participación de H_2O_2 en la liberación de la dormición de semillas de girasol impuesta por el embrión (**Trabajo en redacción**). Por otro lado, resultados preliminares, mostraron diferencias en los perfiles hormonales de ABA, GA₄, AIA (ácido indol-3-acético), OPDA y JA en testa de semillas secas y embebidas de ambas líneas a 0 días post-cosecha (**datos no publicados**). La identificación y cuantificación de las hormonas mencionadas se realizó por Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas Tándem (LC/MS-MS). Recientemente, evaluamos respecto al nivel de dormición, a semillas de la línea pura de girasol A-3. Estas semillas se caracterizan por poseer un alto nivel de dormición a cosecha; teniendo su pericarpo un importante rol en la regulación de la dormición física (**Vigliocco et al., 2017**) El análisis histológico del pericarpo de las líneas B123 (**Andrade et al., 2015**) y A-3 (**Vigliocco et al., 2017**) mostró que la dormición física atribuida al pericarpo está determinada al menos en parte, por el gran tamaño de las células epidérmicas y la ausencia de células parenquimáticas en el área micropilar. Por otro lado, en búsqueda de una solución al problema de variabilidad en la germinación observada en diferentes materiales del Área de fundación de líneas y básicos y de producción comercial del criadero de la Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA) se están evaluando líneas puras e híbrido de girasol en cuanto al carácter de dormición de semillas (**Proyecto SPU; Res. 2016-2641-E-APN-SECPU#ME**). Resultados preliminares mostraron que la eliminación del pericarpo aumentó el porcentaje de germinación en semillas de líneas puras e híbrido con dormición a cosecha. Por otro lado, tratamientos con altas concentraciones de GA₃ y Ethepon fueron efectivos en la liberación de la dormición en todos los genotipos en estudio. Mientras que la eficiencia de los tratamientos con AIA y citocininas (6-benciladenina) dependieron del genotipo evaluado (**datos no publicados**). Estos resultados muestran que futuros estudios son necesarios a fin contribuir a la comprensión integral de los procesos tejido-específicos que regulan la germinación y dormición de semillas de girasol. Más aun, teniendo en cuenta que tales conocimientos pueden contribuir a la búsqueda de soluciones tecnológicas a la problemática de la dormición de semillas de girasol a partir de la mayor demanda de precisión y eficiencia en la siembra por la agricultura moderna.

Como parte de estas líneas de investigación:

- se han finalizado seis Tesis de Grado en las que se analizaron niveles hormonales endógenos (JAs, ABA y GAs) en semillas secas de las líneas B123 y B91, y se correlacionaron con su capacidad germinativa (**Julián Bohano - Natalia Kovacevich**); se evaluaron los niveles endógenos de OPDA, JA y SA en pericarpo de semillas secas y embebidas de ambas líneas al momento de cosecha y luego de su almacenamiento bajo dos condiciones diferentes: tiempo post-cosecha (0 y 33 días) y temperatura (-20°C y 25°C) (**Nataly Riera, Becaria CONICET hasta julio de 2016**); se cuantificó los niveles endógenos de ABA, GA₁ y GA₃ en embriones de semillas secas y embebidas de girasol a los 0 y 33 días post-cosecha a 25°C (**Clarisa Palacio**); se midió el nivel de expresión de genes relacionados al metabolismo y señalización ABA y GAs en semillas secas y embebidas de las líneas B123 y B91 a los 0 días post-cosecha (**Paula Roselló**); se cuantificaron los niveles endógenos de OPDA y JA en eje embrionario y cotiledones de semillas secas y embebidas de las líneas B91 y B123

al momento de cosecha y luego del almacenamiento en seco por 33 días a temperatura ambiente (**Juan Alcoba**).

- se encuentran en ejecución dos Tesis de Grado de la carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas en relación a esta línea de investigación (**Zoé Del Bel-Sara Cumin**).

- está desarrollando tareas de investigación la Adscripta en Investigación **Roxana Reynaga**.

5. CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO

Minimizar el problema de dormición de semillas en girasol es una de los objetivos de la industria semillera con la finalidad de disminuir su incidencia en el sistema productivo. Así, el estudio de los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en la germinación y dormición de semillas de girasol es clave para el desarrollo de nuevas tecnologías tendientes a minimizar los problemas en la producción de girasol derivados de la dormición de semillas; lo que permitirá incrementar la competitividad de este cultivo en el sistema agropecuario. En este contexto, la **hipótesis general** subyacente es: "La acción concertada de nuevos "actores químicos" -brasinoesteroides, estrigolactonas y karrikinas- con las hormonas primarias -ácido abscísico y giberelinas- y las especies reactivas de oxígeno en los diferentes tejidos de la semilla regulan los procesos de germinación y dormición en semillas de girasol".

La hipótesis general planteada se sustenta en los siguientes antecedentes previos y supuestos: (1) semillas de las líneas B123 y A-3 presentaron dormición al momento de cosecha; mientras que semillas de la línea B91 no presentan dormición a cosecha; (2) semillas de las líneas B123 perdieron dormición luego de 33 días de almacenamiento en seco, (3) en semillas de la línea A-3 la dormición impuesta por el embrión comprende un corto período de tiempo (33 días post-cosecha); mientras que la impuesta por el pericarpo comprende un período más largo de tiempo (70 días post-cosecha); (4) se registraron diferencias en el perfil hormonal de pericarpo, testa, eje embrionario y cotiledones de semillas secas y embebidas de las líneas B91 y B123; (5) el contenido de H₂O₂ y la actividad de enzimas del sistema antioxidante (catalasa y ascorbato peroxidasa) se modificaron diferencialmente durante la imbibición temprana en eje embrionario y cotiledones de semillas de girasol de las líneas B123 y B91; (8) la histología del pericarpo de las líneas B123 y A-3, estaría asociado en parte con la dormición física de semillas de ambas líneas.

De acuerdo a los objetivos generales y específicos de este proyecto, la metodología propuesta ha sido seleccionada básicamente en función de la infraestructura y recursos humanos disponibles en nuestro equipo de trabajo. El material vegetal para evaluación de dormición, constituido por líneas endocriadas de girasol, será provisto por los fitomejoradores MSc. Daniel Álvarez de la EEA INTA-Manfredi y la Ing. Marisa Della Maddalena del criadero de Pergamino de la Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA), quienes poseen la infraestructura para multiplicar y regenerar semillas de líneas puras de girasol (ambos integrantes del grupo colaborador).

(La determinación de niveles endógenos de BRs y eventualmente algunas SLs que no se determinen en nuestro laboratorio, se realizarán en un moderno laboratorio del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Palacký (República Checa), referente internacional de la cuantificación de metabolitos con actividad hormonal, y bajo la supervisión del Dr. Miroslav Strnad (integrante del grupo colaborador).

Los tratamientos exógenos (BRs, SLs y KARs), los ensayos de germinación y la cuantificación endógena de SLs, ABA, sus catabolitos y GAs planteados en este plan de investigación se llevan a cabo rutinariamente por el grupo de trabajo con recursos locales, y se desarrollarán en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la UNRC que cuenta con modernos Cuartos Ambientales PR48 Conviron para germinación y crecimiento,

equipo de alta tecnología (LC-ESI-MS/MS) y demás equipamiento básico para realizar este tipo de análisis (Ver detalle en ítem Infraestructura y Equipamiento existente en la Unidad Ejecutora). Los análisis de expresión génica se desarrollarán en colaboración con el laboratorio de en la Cátedra de Cerealicultura, Facultad de Agronomía UBA - Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas (UBA-CONICET) que dispone de equipamiento básico para los análisis moleculares (extracción y cuantificación de ADN, corridas electroforéticas en geles horizontales y verticales), y serán supervisados los Dres. M. V. Rodríguez y D. Batlla (ambos integrantes del grupo colaborador) Las determinaciones de ROS y actividad de enzimas del sistema antioxidantes se realizarán en la cátedra de Anatomía y Fisiología I de la Universidad Nacional de San Luis bajo supervisión de la Dra. M.V. Pérez-Chaca (integrante del grupo colaborador).

6. TIPO DE DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y MÉTODOS

1. Cuantificar los niveles endógenos de brasinoesteroides (BRs) (epibrasinolida y catalisterona entre otras) y estrigolactonas (SLs) (dimetil-sorgolactona y dihidroxi-estrigol entre otras) en eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo de semillas secas y embebidas de las líneas de girasol líneas B91 (sin dormición a cosecha), B123 (con bajo nivel de dormición a cosecha) y A-3 (con alto nivel de dormición a cosecha).

1a. Material vegetal y condiciones de almacenamiento

Las semillas de las líneas puras B91 y B123 serán provistas por el MSc. Daniel Álvarez de la EEA INTA-Manfredi y las de la línea A-3 por la Ing. Marisa Della Maddalena de la Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA). Inmediatamente luego de la cosecha a campo, las semillas serán almacenada a -20°C a fin de conservar su nivel de dormición.

1b. Obtención de material vegetal

I- *Semillas secas*: Veinticinco semillas (por repetición) de las líneas B91, B123 y A-3 serán seccionadas cuidadosamente en eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo. Inmediatamente ambas partes se congelaron en N_2 líquido, liofilizaron y conservaron a -20°C hasta las determinaciones hormonales. Para el ensayo de expresión génica los ejes embrionarios se conservaran a -80°C hasta su uso.

II- *Semillas embebidas*: Veinticinco semillas (por repetición) de las líneas B91, B123 y A-3 se sembraran en bandejas de plástico entre toallas de papel húmedo y se colocaran a germinar en condiciones ambientales generadas por Cuartos Ambientales PR48 Conviron de crecimiento programados con 8 h de oscuridad a 18°C y 90% de HR y 16 h de luz ($130 \mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$) a 28°C y 85% de HR. A las 3, 6 y 12 h de imbibición las semillas se cosecharan y seccionaran en eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo, e inmediatamente se congelaran en N_2 líquido, liofilizaran y conservaran a -20°C hasta las determinaciones hormonales. Para el ensayo de expresión génica los ejes embrionarios se conservaran a -80°C hasta su uso.

1c. Extracción, purificación y cuantificación de brasinoesteroides

La extracción de BRs se llevará a cabo según Tarkowská et al. (2016). 200 mg de peso seco de eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo se homogeneizaron utilizando 1 ml de acetonitrilo 60% en hielo frío como solvente de extracción. Al homogenato se le agregarán los estándares deuterados correspondientes a cada una de los brasinoesteroides analizados. La extracción se realizará en

agitación toda la noche a 4°C y posteriormente se centrifugará 10 min a 36,670 x g a 4°C. Al pellet obtenido se le realizará una nueva extracción en agitación por 60 min a 4°C. Los sobrenadantes serán combinados y purificados utilizando una columna Discovery® DPA-6S (50 mg, Supelco®, Bellefonte, PA, USA) activada con MeOH 100 %, llevándose posteriormente, los extractos a sequedad bajo vacío. Los extractos secos se resuspenderán en 100 µL de MeOH 100 % agitando en vórtex y sonicando por 5 min; para finalmente diluirse a 1 ml con agua Milli-Q antes de purificarse en una columna Isolute® C4 SPE cartridge (100 mg, Isolute® C4, Biotage, UK). La columna será activada con 1 ml de MeOH 100% y equilibrada con 1 ml de MeOH 10%. Luego la columna C4 será lavada con 1 ml de MeOH 10 % y los BRs serán eluidos con 1 ml de MeOH 100%. Finalmente la fracción de elución será evaporada a sequedad al vacío y almacenada a -20°C hasta el posterior análisis.

La identificación y cuantificación de BRs realizará utilizando un Espectrómetro de Masa acoplado a un Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance (UHPLC-ESI-MS/MS). Los extractos secos de las muestras conteniendo BRs se retomaran con 50 µl de MeOH 100% (enfriado a -20°C), inyectándose 5 µl de la muestra en una columna de fase reversa (Acquity UPLC® CSH™ C18, 2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm; Waters) acoplado a un ESI-MS/MS.

Todos los análisis se realizarán utilizando la fuente de electrospray en modo de ionización positivo. La cuantificación se llevará a cabo por inyección de las muestras en modo MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples). La adquisición de datos por MRM se realizará por monitoreo de iones parentales y transiciones para BRs puros y sus respectivos estándares deuterados. Los datos serán procesados utilizando el software MassLynx™ (ver. 4.1, Waters).

1d. Extracción, purificación y cuantificación de estrigolactonas

La extracción y purificación de SLs se llevará a cabo según protocolo de Durgbanshi et al. (2005) con modificaciones. 200 mg de peso seco de eje embrionario, cotiledones, testa y pericarpo se triturará en mortero con N₂ líquido y 5 ml de agua deionizada (solvente de extracción). Los extractos se transvasarán a tubos Falcon de 50 ml y se homogeneizarán utilizando un ultraturrax. Luego se centrifugarán a 5000 rpm durante 15 min. Se recogerá el sobrenadante y se ajustará el pH a 2,8 con ácido acético 15%. Posteriormente se realizará una doble partición con éter etílico, se descartarán las fases acuosas y se recogerán las fases orgánicas, llevándose a sequedad en evaporador rotativo. Los extractos secos se resuspenderán con 1,5 ml de metanol (MeOH), filtrarán a través de un filtro de jeringa (velocidad de flujo menor a 1ml/min) en cámara de vacío y se secarán a temperatura ambiente en SpeedVac. El análisis de los compuestos de interés se realizará mediante Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas Tándem (LC-ESI/MS-MS), equipo que detecta compuestos con actividad hormonal a nivel de pmol. Para ello, los extractos secos se resuspenderán en 50 µl de MeOH para la purificación mediante un cromatógrafo Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una bomba cuaternaria con auto inyector de muestra. Se utilizará una columna Resteck C18 (Resteck USA, 2.1 x 100 mm, 5 µm) a 25°C, con un volumen de inyección de 10 µl. La elución se llevará a cabo en gradiente con un sistema de solvente binario: 0.2% HOAc en H₂O (solvente B)/ MeOH (solvente A) a una velocidad de flujo de 200 µl min⁻¹, procediendo con las siguientes proporciones (v/v) de solvente A: (t (min), %A):(0, 40), (25, 80). La identificación y cuantificación se realizará mediante un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo (Micromass Quatro Ultima™PT, Manchester City, UK). Todos los análisis se realizarán utilizando la fuente de electrospray en modo de ionización negativo. La cuantificación se llevará a cabo por inyección de las muestras en modo SIR. Los datos serán procesados utilizando el software MassLynx™ (ver. 4.1, Waters).

2. Estudiar el patrón de expresión de genes que participan en el metabolismo hormonal de tales hormonas: LK (esterol 5α-reductasa), CYP85A1 (C6-oxidasa), CCD7 y CCD8 (dioxigenasas 7 y 8) en eje embrionario de semillas secas y embebidas de las líneas de girasol líneas B91, B123 y A-3.

2a. Niveles de expresión de genes por PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Los niveles de expresión de los genes *LK* (esterol 5 α -reductasa; síntesis de BRs), *CYP85A1* (C6-oxidasa; síntesis de BRs), *CCD7* y *CCD8* (dioxigenasas 7 y 8; síntesis de SLs) serán probados en eje embrionario de semillas secas y embebidas sometidas a las condiciones descritas anteriormente.

El diseño de los pares de primers específicos se realizará empleando el software *Primer3* versión 4.0 (Rozen and Skaletsky, 2000). El volumen final de cada reacción será de 20 μ l, y contendrá: 10 μ l de 2X SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems), 300 nM de cada primer y 1 μ l de cDNA como templado. Las reacciones de PCR se llevarán a cabo en un equipo Rotor Gene 6000 (Corbett Research) mediante el siguiente programa: 50°C por 2 min, 95°C por 1 min, y luego 40 ciclos de 95°C por 15 s y finalmente 60°C durante 1 min. Concluida la etapa de amplificación, las reacciones serán sometidas a un incremento gradual de temperatura para generar una curva de disociación, medida como cambios en los valores de fluorescencia en función de la temperatura. Mediante este proceso se detectará la presencia de producto amplificado no específico. El programa de disociación será de 95°C por 15 s, 60°C por 15 s, seguido por 20 min de un incremento gradual de temperatura desde 60°C hasta 95°C. Los genes que se utilizarán como genes de referencia (controles internos) para la posterior normalización serán Actina 2, Beta Tubulina y Elongation Factor 1 alfa. La cuantificación de los cambios relativos en la expresión génica se realizará mediante el método 2(-Delta Delta C(T) descrito por Livak y Schmittgen (2001).

3. Correlacionar el contenido endógeno de brasinoesteroides y estrigolactonas en eje embrionario de semillas secas y embebidas con el patrón de expresión de genes del metabolismo hormonal.

Se analizarán exhaustivamente bases de datos y bibliografía pertinente para establecer las posibles relaciones entre los cambios en el perfil hormonal de BRs y SLs del Obj. Esp. 1 con los transcritos de la expresión diferencial que surjan del Obj. Esp. 2. Además, se compararán los perfiles hormonales y de expresión génica registrados en semillas con diferente nivel de dormición a fin de dilucidar la participación de estos compuestos en la germinación y/o dormición de semillas de girasol.

4. Evaluar la acción de brasinoesteroides, estrigolactonas y karriquinas sobre la germinación y dormición de semillas de girasol a través de aplicaciones exógenas. Asimismo se evaluará la acción de estos compuestos sobre el contenido endógeno de ABA, sus catabolitos (ácido faseico, PA; dihidrofaseico, DPA y ABA-glucosil éster, ABA-GE) y GAs (GA₁, GA₃, GA₄, y GA₇) y del nivel de expresión de genes (*ABI3*, *Abcisic acid insensitive 3* y *RGL2*, *RGA-like 2*) en eje embrionario de semillas secas y embebidas de B91, B123 y A-3.

4a. Aplicación exógena de brassinoesteroides, estrigolactonas y karriquinas

Los tratamientos exógenos se efectuarán sobre 100 cipselas dispersando la solución hormonal correspondiente (50 μ l de solución/gr de cipselas) con micropipeta y realizando agitación vigorosa durante 2 minutos para facilitar su penetración en el tejido. Los tratamientos a aplicar serán: agua destilada (control), 24-epibrasinolida a 0,5 μ M y 2,5 μ M, GR24 (SL) a 20 μ M y 5 μ M, y KAR2 (KAR) a 1 μ M y 1 mM.

4b. Determinación de poder germinativo

Veinticinco semillas (por repetición) controles y tratadas se sembrarán en bandejas entre toallas de papel húmedo y se colocarán a germinar bajo condiciones mencionadas en Obj. Esp. 1b. El recuento de germinación se realizará diariamente hasta los 10 días post-siembra. Se considerarán germinadas aquellas semillas que presenten emergencia de radícula.

4c. Obtención de eje embrionario para evaluar niveles hormonales endógenos, expresión génica, especies reactivas del oxígeno y actividad de enzimas del sistema antioxidante

I- Semillas secas: Ejes embrionarios de veinticinco semillas controles y tratadas (por repetición) serán separados cuidadosamente. Inmediatamente serán congelados en N₂ líquido, liofilizados y conservados a -20°C hasta su uso. Para el ensayo de expresión génica los ejes embrionarios se conservarán a -80 °C hasta su uso.

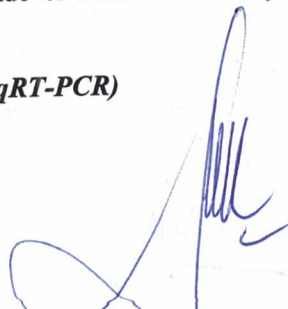
II- Semillas embebidas: Veinticinco semillas (por repetición) controles y tratadas se sembrarán en bandejas entre toallas de papel húmedo y se colocarán a germinar bajo condiciones mencionadas en Obj. Esp. 1b. A las 3, 6 y 12 h de imbibición las semillas se cosecharán, se separarán cuidadosamente los ejes embrionarios, e inmediatamente se congelarán en N₂ líquido, liofilizarán y conservarán a -20°C hasta las determinaciones hormonales. Para el ensayo de expresión génica los ejes embrionarios se conservarán a -80 °C hasta su uso.

4d. Extracción, purificación, identificación y cuantificación de fitohormonas

ABA y sus catabolitos (ácido faseico, PA; dihidrofaseico, DPA y ABA-glucosil éster, ABA-GE) y GAs (GA₁, GA₃, GA₄, y GA₇) se determinarán en eje embrionario de semillas control y tratadas a las 0, 3, 6 y 12 h de imbibición.

La extracción y purificación de ABA y sus catabolitos (ácido faseico, PA; dihidrofaseico, DPA y ABA-glucosil éster, ABA-GE) y GAs (GA₁, GA₃, GA₄, y GA₇) se llevará a cabo según protocolo de Durgbanshi et al. (2005) con modificaciones. 200 mg de peso seco de eje embrionario de se triturará en mortero con N₂ líquido y 5 ml de agua deionizada (solvente de extracción). Los extractos se transvasarán a tubos Falcon de 50 ml. Se adicionará 50 ng de los respectivos estándares deuterados de cada hormona. Cada muestra se pasará brevemente por ultraturrax para completar la homogeneización y facilitar la equilibración de estándares. Luego se centrifugarán a 5000 rpm durante 15 min. Se recogerá el sobrenadante y se ajustará el pH a 2,8 con ácido acético 15%. Posteriormente se realizará una doble partición con éter etílico, se descartarán las fases acuosas y se recogerán las fases orgánicas, llevándose a sequedad en evaporador rotativo. Los extractos secos se resuspenderán con 1,5 ml de metanol (MeOH), filtrarán a través de un filtro de jeringa (velocidad de flujo menor a 1ml/min) en cámara de vacío y se secarán a temperatura ambiente en SpeedVac. El análisis de los compuestos de interés se realizará mediante Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas Tándem (LC-ESI/MS-MS), equipo que detecta compuestos con actividad hormonal a nivel de pmol. Para ello, los extractos secos se resuspenderán en 50 µl de MeOH para la purificación mediante un cromatógrafo Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una bomba cuaternaria con auto inyector de muestra. Se utilizará una columna Resteck C18 (Resteck USA, 2.1 x 100 mm, 5 µm) a 25°C, con un volumen de inyección de 10 µl. La elución se llevará a cabo en gradiente con un sistema de solvente binario: 0.2% HOAc en H₂O (solvente B)/ MeOH (solvente A) a una velocidad de flujo de 200 µl min⁻¹, procediendo con las siguientes proporciones (v/v) de solvente A: (t (min), %A):(0, 40), (25, 80). La identificación y cuantificación se realizará mediante un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo (Micromass Quatro UltimaTMPT, Manchester City, UK). Todos los análisis se realizarán utilizando la fuente de electrospray en modo de ionización negativo. La cuantificación se llevará a cabo por inyección de las muestras en modo MRM. La adquisición de datos por MRM se realizará por monitoreo de iones parentales y transiciones para las hormonas puras y sus respectivos estándares deuterados. Los datos serán procesados utilizando el software MassLynxTM (ver. 4.1, Waters).

4e. Niveles de expresión de genes por PCR en tiempo real (qRT-PCR)



El nivel de expresión de los genes *ABI3* y *RGL2* se medirá en eje embrionario de semillas control y tratadas a las 0, 3, 6 y 12 h de imbibición según metodología descrita en Obj. Esp. 2a.

5. Evaluar el efecto de la aplicación exógena de BRs, SLs y KARs sobre el contenido endógeno de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido (O_2^-) y la actividad de enzimas antioxidante como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) en eje embrionario de semillas secas y embebidas de B91, B123 y A-3.

Las determinaciones de H_2O_2 , O_2^- y la actividad de enzimas del sistema antioxidante se efectuarán en eje embrionario de de semillas control y tratadas a las 0, 3, 6 y 12 h. La obtención del material vegetal se realizará según metodología descrita en Obj. Esp. 4c.

5a. Cuantificación de ROS

1- *Determinación de H_2O_2* : se empleará el protocolo descrito por Sergiev et al. (1997). Se medirá la absorbancia a 390 nm. El contenido de H_2O_2 será calculado a partir de una curva de calibración con concentraciones conocidas preparadas a partir de H_2O_2 comercial.

2- *Determinación de O_2^-* : se utilizará el fluorocromo dihidroetidio (DHE) capaz de atravesar pasivamente las membranas celulares y reaccionar con O_2^- , dando lugar a un compuesto oxidado fluorescente denominado oxietidio (Oxy-E) (Fink et al., 2004). Para comprobar la especificidad del fluorocromo por el anión superóxido, las muestras se incubaran con tetrametilpiperidina (TMP), secuestrador de O_2^- (control negativo). Ejes embrionarios se incubaran con o sin TMP 1 mM 1h a temperatura ambiente, luego en una solución de DHE 10 μ M preparado en buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) por el término de 30 min a 37°C en oscuridad y finalmente se enjuagaran durante 30 min con el mismo buffer. DHE tendrá longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión a 520 nm. Para la cuantificación de O_2^- utilizará el programa Leica Application Suite (LASAF).

5b. Determinación de actividad enzimática

1- *Actividad SOD*: se llevará a cabo de acuerdo a Beauchamp y Fridovich (1973) y Beyer y Fridovich (1987), con modificaciones. La concentración se determinará por medición de la absorbancia a 560 nm.

2- *Actividad CAT*: será determinada de acuerdo a Vanacker et al. (2000) utilizando 0.1 M HEPES pH 6.5, 10 mM MgCl₂ y 5 mM EDTA.

3- *Actividad APX*: se determinará de acuerdo a Shalata et al. (2001) y Hossainy Asada (1984), con modificaciones. La actividad enzimática se determinará espectrofotométricamente por disminución de la absorbancia a 290 nm debido a la oxidación del ascorbato. Una unidad APX se definirá como la cantidad de enzima requerida para producir la desaparición de 1 μ mol de ascorbato luego de 1 min de reacción.

6. Evaluar el nivel de expresión de los genes *ABCG30* (*ATP-Binding Cassette G30*) y *NPF3* (*Nitrate Transporte1/Peptide Transporter 3*) involucrados en la síntesis de transportadores de ABA y GAs presentes en eje embrionario de semillas de B91, B123 y A-3.

El nivel de expresión de los genes *ABCG30* y *NPF3* se medirá en eje embrionario de semillas control y tratadas a las 0, 3, 6 y 12 h de imbibición. La obtención del material vegetal se realizará según metodología descrita en Obj. Esp. 4c.

Reproducibilidad de las determinaciones y análisis estadístico

Se utilizará un diseño experimental completamente aleatorizado. Los tratamientos exógenos (BRs, SLs y KARs), el poder germinativo, la cuantificación del contenido de ROS y la actividad de enzimas del sistema antioxidante se evaluarán por cuadruplicado. Las determinaciones hormonales endógenas se efectuarán a partir de cuatro extracciones independientes y dos inyecciones por cada muestra en los equipos UHPLC-ESI-MS/MS y LC-ESI/MS-MS según corresponda. Los datos de poder germinativo, niveles hormonales endógenos, contenido de ROS y actividad enzimática serán analizados con el programa InfoStat Professional (Di Rienzo et al., 2014) empleando el test ANNOVA para la comparación de medias de las variables evaluadas. Se empleará a posteriori un test de Rangos Múltiples de diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher; $p \leq 0.05$). Para niveles de expresión de genes se realizarán tres extracciones independientes de RNA, y cada reacción de PCR se efectuará por triplicado usando el mismo cDNA como templado. Las reacciones de qPCR se repetirán al menos dos veces para confirmar los resultados de cada cDNA. Los datos se analizarán por ANNOVA y test de Tukey para la comparación de medias.

7. CRONOGRAMA DE TRABAJO

Actividades	Año 1	Año 2	Año 3
1 a y b			
1c			
1d			
2a			
3			
4 ^a			
4b			
4c			
4d			
4e			
5 ^a			
5b			
6			

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, P.K. 2011. Climate change and its impact on agriculture. En: Souvenir-Indian Seed Congress, Feb. 22nd-23rd, Hyderabad. pp. 67-76.
- Andrade, A. et al. 2015. Pericarp anatomy and hormone profiles of cypselas in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. *Plant Biol.* 17: 351-360.
- ASAGIR, 2018. Avanza el Proyecto Brechas. <http://www.asagir.org.ar>. Consultado: 23.08.2018.
- Bahin, E. et al. 2011. Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ.* 34: 980-993.

- Bailly, C. et al. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331: 806-814.
- Beauchamp, C.O., Fridovich I. 1973. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim. Biophys. Acta.* 12: 50-64.
- Benech-Arnold, R.L. et al. 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.
- Beyer, W.F., Fridovich I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
- Bolsa de Cereales Bs. As. 2018. Panorama Agrícola semanal. <http://www.bolsadecereales.com/pas>. Consultado: 14.07.2018.
- Bouwmeester, H.J. et al. 2003. Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 358-64.
- Bove, J. et al. 2005. Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana glumbaginifolia*. *Plant Mol. Biol.* 57: 593-612.
- Brunick, R.L. 2007. Seed dormancy in domesticated and wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.): types, longevity and QTL discovery. Oregon State University. Department of Horticulture. Doctoral Dissertation.
- Castaña, F.D. 2018. The sunflower crop in Argentina: past, present and potential future. *OCL* 25: D105.
- Chitnis, V.R. et al. 2014. After-Ripening induced transcriptional changes of hormonal genes in wheat seeds: The cases of brassinosteroids, ethylene, cytokinin and salicylic acid. *PLoS ONE* 9: e87543.
- Di Rienzo, J.A. et al. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dixon, K.W. et al. 2009. Karrikinolide: a phytoactive compound derived from smoke with applications in horticulture, ecological restoration, and agriculture. *Acta Hort.* 813: 155-170.
- Durgbanshi, A. et al. 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. et al. 2015. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant Cell Environ.* 38: 364-374.
- Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.
- Fink, B. et al. 2004. Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287: 895-902.
- Flematti, G.R. et al. 2015. What are karrikins and how were they 'discovered' by plants? *BMC Biol.* 13:1.
- Gazzarrini, S., Tsai A.Y. 2015. Hormone cross-talk during seed germination. *Essays Biochem.* 58: 151-64.
- Gianinetti, A. et al. 2018. Seed dormancy involves a transcriptional program that supports early plastid functionality during imbibition. *Plants* 7: 35. <https://doi.org/10.3390/plants7020035>.
- Graeber K.A.I. et al. 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environ.* 35: 1769-1786.
- Hossain, M.A., Asada A. 1984. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 25: 1285-1295.
- Hu, Y., Yu D. 2014. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 4394-408.
- Jain, N. et al. 2006. A butenolide, isolated from smoke, can overcome the detrimental effects of extreme temperatures during tomato seed germination. *Plant Growth Regul.* 49: 263-267.

- Jiang, L. et al. 2013. DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature* 504: 401-405.
- Kang, J. et al. 2015. Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nat. Commun.* 6: 8113.
- Kanno, Y. et al. 2012. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 9653-9658.
- Koornneef, M. et al. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36
- Leubner-Metzger, G. 2005. β -1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant J.* 41: 133-145.
- Leymarie, J. et al. 2007. Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *J. Exp. Bot.* 3: 425-437.
- Livak, K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$. *Methods* 25: 402-408.
- Maiti R.K., et al. 2005 Genotypic variability in seed dormancy in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes and the effects of priming in breaking dormancy and improving seedling vigour. *Crop Res.* 30: 291-298.
- Maiti, R.K. et al. 2006. Studies on genotype variability and seed dormancy in sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.). *Indian J. Crop Sci.* 1: 84-87.
- Meng, Y. et al. 2017. Karrikins: Regulators involved in phytohormone signaling networks during seed germination and seedling development. *Front. Plant Sci.* 7:2021.
- Nonogaki, H. 2017. Seed biology updates-highlights and new discoveries in seed dormancy and germination. *Front. Plant Sci.* 8: 524.
- Oracz, K. et al. 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J.* 50: 452-465.
- Oracz K., Karpinski S. 2016. Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Front. Plant Sci.* 7: 864.
- Panigo, N. et al. 2007. Sunflower. En: Ed. Kole, C. *Genome mapping and molecular breeding in plants. Oilseeds.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 153-177.
- Park, J. et al., 2017. Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know. *BMC Biol.* 15: 93.
- Roselló, P. et al. 2016. Differential hormonal and gene expression dynamics in two inbred sunflower lines with contrasting dormancy level. *Plant Physiol. Biochem.* 102: 133-140.
- Rodríguez, M.V. et al. 2011. Challenges facing seed banks and agriculture in relation to seed quality. En: Kermodé, A.R., editor, *Seed dormancy. Methods in molecular biology.* Humana Press, New York. pp. 17-40.
- Rozen S., Skaletsky H.L. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* (Eds.) Krawetz S., Misener S. Humana Press, Totowa, N.J., pp. 365-386.
- Sergiev, I. et al. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comp. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 51: 121-124.
- Shalata, V. et al. 2001. Response of cultivated tomato and its wild salt-tolerance relative *Lycopersicon pennellii* to salt dependent oxidative stress: the root antioxidant system. *Physiol. Plant.* 112: 487-494.
- Shu, K. et al. 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: *Phytohormones - Signaling mechanisms and crosstalk in plant development and stress responses.* <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68735>.
- Stanga, J.P. et al. 2013. SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1 controls seed germination and seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 163: 318-330.



- Steber, C.M., McCourt P. 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125: 763-9.
- Stevens, J. et al. 2007. Seed germination of agricultural weeds is promoted by the butenolide 3-methyl-2H-furo [2, 3-c] pyran-2-one under laboratory and field conditions. *Plant Soil* 298: 113-124.
- Tal, I. et al. 2016. The *Arabidopsis* NPF3 protein is a GA transporter. *Nat. Commun.* 7: 11486.
- Tarkowská, D. et al. 2016. The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal. Chem.* 408: 6799-6812.
- Toh, S. et al. 2012. Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell Physiol.* 53: 107-117.
- Vanacker, H. et al. 2000. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol.* 123: 1289-1300.
- Vigliocco, A. et al. 2017. Dormancy in sunflower line A-3: the role of the pericarp. 2017. *Botany* 95: 353-358.
- Vishal, B., Kumar P.P. 2018. Regulation of seed germination and abiotic stresses by gibberellins and abscisic acid. *Front. Plant Sci.* 9:838. doi: 10.3389/fpls.2018.00838.
- Vujaković, M. et al. 2012. Seed dormancy of hybrids and parent lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* 35: 111-118.
- Waters, M.T. et al. 2014. The karrikin response system of *Arabidopsis*. *Plant J.* 79: 623-631.
- Weitbrecht, K. et al. 2011. First off the mark: early seed germination. *J. Exp. Bot.* 62: 3289-3309.
- Wojtyla, L. et al. 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Front. Plant Sci.* 7: 66.
- Xi, W. et al. 2010. MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 1733-1748.



Dra. MARÍA MARTA REYNOSO
Sec. Académica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.



Dra. MARISA ROVERA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.

