

**Regulación ambiental de los cambios en el nivel de dormición durante la salida de la dormición primaria y la entrada en dormición secundaria en semillas de *Polygonum aviculare* L.: el papel de la temperatura y la disponibilidad hídrica del suelo**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Agropecuarias*

**Cristian Jonatan Malavert Pineda**

Ingeniero Agrónomo - Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas, Cuba  
Año de egreso 2009

Lugar de Trabajo:

Cátedra de Cultivos Industriales / IFEVA

Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires / CONICET



Escuela para Graduados, Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



2017



## COMITÉ CONSEJERO

### **Director de Tesis:**

Roberto Luis Benech-Arnold  
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)  
Ph. D (University of Southampton)

### **Co-director:**

Diego Batlla  
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)  
Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

## JURADO DE TESIS

### **Director de Tesis:**

Roberto Luis Benech-Arnold  
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)  
Ph. D (University of Southampton)

### JURADO

#### **Javier Botto**

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)  
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

### JURADO

#### **Guillermo Chantre**

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Sur)  
Doctor en Agronomía (Universidad Nacional del Sur)

### JURADO

#### **José Luis González Andújar**

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid)  
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid)

Fecha de defensa de la tesis: 15/12/2017

“Si he logrado ver más lejos, es porque he subido a hombros de Gigantes”

Isaac Newton, 1676

## DEDICATORIA

A Dios. Por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecerme en los momentos difíciles e iluminar mi mente para avanzar y por haber puesto en mi camino a personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este período de estudio.

A mi madre, Alma Elizabeth. Por estar siempre dispuesta a escucharme y ayudarme en momentos difíciles. Por sus consejos, sus valores, por su motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor y comprensión.

A mis hermanos, Franklin, Alma, Cristi, Ariel y Josué. Porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindaron y me brindan me dieron la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A mis tías en Honduras, Janeth, Leonor, Alejandrina y Esperanza, a pesar de no estar presentes físicamente, sé que procuran mi bienestar y estuvieron pendientes de los avances de este proyecto de tesis.

A mi tío Dr. Arnold Spitta. Por su apoyo incondicional en cada etapa de este proceso. Por ser ejemplo de perseverancia y constancia, por su valor mostrado para salir adelante y por su cariño.

A mi familia en Argentina: Beatriz, Alejandro, Nico, Sabrina y Elu (la niña más linda del mundo).

A mis amigos. Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Omar Barrera, Rudy, Miguel, Roy, Ansary, Pablito, Miguel parece.

A todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. ¡Gracias totales!

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios quién supo guiarme en este camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en las dificultades que se presentaron, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca de vista el objetivo ni desfallecer en el intento.

A Roberto Benech-Arnold y Diego Batlla por la confianza que depositaron en mí al sumarme a su equipo de trabajo y a sus proyectos. Gracias por guiarme en este camino de las ciencias agropecuarias, por sus consejos, sus comentarios y, en especial, por darme la libertad y el apoyo para continuar con sus ideas y conducir las por un nuevo camino. Han inculcado en mi formación como docente e investigador el esfuerzo, el compromiso, el optimismo y la calidad.

A Pedro Gundel, por sus consejos acompañados con mates. A Patricia del Fueyo por las charlas y consejos brindados.

A mis compañeros de la Cátedra de Cultivos Industriales, en especial a aquellos que se han convertido en grandes amigos y compañeros con el pasar de los años. Por los viajes a los congresos, los asados en el campito de cultivos (muy buenos, por cierto), las fiestas de disfraces, los mates en la oficina de becarios. A Rocío Belén Fernández, Coni Domínguez, Kelly Mercado, Robin Navarrete, Marianne Torcat, Magui Nico, Fer Oreja, Rulo Giménez, Quique Otero, Cris Ríos, Chalo Arata, Lu Pizzorno, Juan Candao, Nati Laspina, Tony Barrios.

A los profesores de la Cátedra de Cultivos Elba de la Fuente, Adriana Kantolic, Patricia Giménez, Mónica López, Alejandra Gil, Adrianita Lenardis, Nora Gómez, Edy Ploschuk, Diego Wassner, Daniel Sorlino, Mirta Denkovski.

A los compañeros de las Cátedras de Cereales y Producción vegetal.

A los compañeros de IFEVA, Romi Cavagnaro, Daniel Bastías, Mercedes Keller, Mariano Mangieri. Por esas charlas filosóficas en las que siempre queremos salvar al mundo.

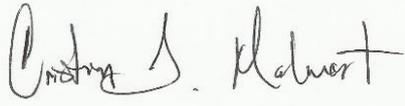
A CONICET por otorgarme la Beca Latinoamericana de Doctorado y permitirme hacer de un sueño una realidad.

A la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, por adoptarme y hacerme parte de ella.

A todo el personal de la EPG por su ayuda y buena predisposición en todo momento.

## DECLARACIÓN

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.*

A handwritten signature in black ink on a light green rectangular background. The signature is written in a cursive style and reads "Cristian Malavert".

*Ing. Agr. Cristian Malavert*

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- **Malavert, C.**, Batlla, D. y Benech-Arnold R.L. (2017). Temperature-dependent regulation of induction into secondary dormancy of *Polygonum aviculare* L. seeds: A quantitative analysis. *Ecological Modelling* 352:128-138.
- **Malavert, C.**, Batlla, D. y Benech-Arnold R.L. () The role of water content as a modulator of the effect of temperature on the dynamics of dormancy changes in *Polygonum aviculare* L. seeds. Manuscrito en preparación.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
SIGLAS Y ABREVIATURAS UTILIZADAS .....	xxii
TÍTULO Y RESUMEN .....	xxv
TITLE AND ABSTRACT .....	xxvi

## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL: REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA.....**

1.1 Concepto y definición de Maleza.....	1
1.2 Dormición de semillas .....	2
1.3 Factores del ambiente que regulan cambios en el nivel de dormición.....	3
1.4 Factores que actúan como terminadores de la dormición .....	5
1.4.1 Luz.....	5
1.4.2 Temperaturas alternadas .....	7
1.5 Desarrollo de modelos predictivos.....	7
1.6. Planteo del problema.....	8
1.7 Caso de estudio: <i>Polygonum aviculare</i> L. (Sanguinaria o cien nudos).....	9
1.8 Objetivos e Hipótesis .....	11
1.8.1 Objetivo general del proyecto .....	11
1.8.2 Objetivos específicos e hipótesis .....	11
1.9 Estructura de la Tesis .....	12

## **CAPÍTULO 2: REGULACIÓN DE LA INDUCCIÓN EN DORMICIÓN SECUNDARIA EN FUNCION DE LA TEMPERATURA EN SEMILLAS DE *Polygonum aviculare* L.: UN ANÁLISIS CUANTITATIVO.....**

2.1 Introducción .....	16
2.2 Materiales y métodos .....	18
2.2.1 Condiciones térmicas durante el almacenamiento .....	18
2.2.1.1 Salida de la dormición primaria .....	18
2.2.1.2 Inducción en dormición secundaria .....	19
2.2.2 Test de germinación .....	19
2.2.3 Determinación de los parámetros térmicos que caracterizan el nivel de dormición de la población .....	19
2.2.4 Evaluación del ajuste entre los datos observados y los pronosticados.....	21
2.2.5 Generación del modelo de inducción en dormición secundaria .....	21
2.2.6 Evaluación del modelo.....	22
2.3 Resultados .....	22
2.3.1 Parámetros térmicos de la población de semillas durante la salida de la dormición primaria y la inducción en dormición secundaria .....	22
2.3.2 Modelo de inducción en dormición secundaria .....	26
2.3.3 Validación del modelo .....	28
2.4 Discusión .....	29

<b>CAPÍTULO 3: EL PAPEL DE LA DISPONIBILIDAD HÍDRICA COMO MODULADOR DE LA DINÁMICA DE LA SALIDA DE LA DORMICIÓN PRIMARIA E INDUCCIÓN EN DORMICIÓN SECUNDARIA EN SEMILLAS DE <i>Polygonum aviculare</i> L.</b>	37
3.1 Introducción	37
3.2 Materiales y métodos	38
3.2.1 Recolección y preparación del material vegetal	38
3.2.2 Condiciones experimentales durante la salida de la dormición primaria	38
3.2.3 Condiciones experimentales durante la entrada en dormición secundaria	39
3.2.4 Test de germinación	40
3.2.5 Cuantificación de los parámetros térmicos durante la salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria	41
3.2.6 Evaluación del ajuste entre los valores observados y predichos	41
3.2.7 Desarrollo del modelo	42
3.2.8 Evaluación del modelo	42
3.3 Resultados	43
3.3.1 Dinámica de germinación durante la salida de la dormición primaria de semillas estratificadas con diferentes contenidos hídricos	43
3.3.2 Cuantificación de los parámetros térmicos que caracterizan los cambios en el nivel de dormición durante la salida de la dormición primaria	44
3.3.3 Modelo de salida de la dormición primaria en función de la disponibilidad hídrica de las semillas	45
3.3.4 Germinación de semillas con diferente contenido hídrico durante la entrada en dormición secundaria	47
3.3.5 Cuantificación de los parámetros térmicos que caracterizan los cambios en el nivel de dormición durante la entrada en dormición secundaria	49
3.3.6 Modelo de entrada en dormición secundaria en función de la disponibilidad hídrica de las semillas	50
3.3.7 Validación del modelo	51
3.4. Discusión	54

<b>CAPÍTULO 4: CAMBIOS EN EL NIVEL DE DORMICIÓN EN SEMILLAS DE <i>Polygonum aviculare</i> L. DURANTE LA INDUCCIÓN EN DORMICIÓN SECUNDARIA, MEDIDOS A PARTIR DE CAMBIOS EN LA SENSIBILIDAD A LA LUZ Y A LAS TEMPERATURAS ALTERNADAS</b>	60
4.1 Introducción	60
4.2 Materiales y métodos	62
4.2.1 Recolección y preparación del material vegetal	62
4.2.2 Salida de la dormición primaria	62
4.2.3 Inducción en dormición secundaria	62
4.2.4 <b>Experimento 1.</b> Cambios en la sensibilidad a la luz durante la entrada en dormición secundaria	63
4.2.4.1 Test de germinación	63

4.2.4.2 Desarrollo del modelo .....	63
4.2.4.3 Evaluación del modelo .....	64
4.2.5 <b>Experimento 2.</b> Cambios en la sensibilidad a las temperaturas alternadas durante la entrada en dormición secundaria.....	64
4.2.5.1 Test de germinación .....	64
4.2.5.2 Desarrollo del modelo .....	65
4.2.5.3 Evaluación del modelo .....	65
4.3 Resultados .....	66
4.3.1 Cambios en la sensibilidad a la luz durante la salida de la dormición primaria y la entrada en dormición secundaria.....	66
4.3.1.1 Desarrollo del modelo .....	68
4.3.1.2 Evaluación del modelo .....	69
4.3.2 Cambios en la sensibilidad a las temperaturas alternadas durante la salida de la dormición primaria y entrada en dormición secundaria.....	71
4.3.2.1 Desarrollo del Modelo .....	76
4.3.2.2 Evaluación del modelo .....	78
4.4 Discusión .....	79
<b>CAPÍTULO 5:</b> Discusión general .....	86
5.1 Introducción .....	86
5.2. Esquema general y contraste de Hipótesis .....	86
5.3 Avances en el Modelo Conceptual .....	87
5.4 Contribución al avance del conocimiento: Desarrollo de modelos predictivos.....	88
5.5 Nuevas interrogantes y futuras líneas de investigación .....	92
5.6 Conclusiones .....	93
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	95

## ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 2.1** Estimación de los parámetros térmicos para la población de semillas de *P. aviculare* durante la salida de la dormición primaria a diferentes temperaturas de estratificación (1,6, 5 y 10 °C). Los parámetros térmicos ( $T_{l(50)}$ ,  $\sigma_{Tl}$ ,  $T_{h(50)}$ ,  $\sigma_{Th}$ ) se obtuvieron a partir de datos de germinación obtenidos experimentalmente a temperaturas constantes de 10 y 15 °C a través del ajuste de las curvas de germinación simuladas para semillas estratificadas a 1,6, 5 y 10 °C que acumularon la misma cantidad de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt} = \text{°Cd}$ ). La simulación se realizó utilizando las ecuaciones descritas en el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Se asumió que  $T_b$ ,  $T_o$  y  $T_m$  no varían durante el período de la estratificación, los valores de 0, 25 y 35 °C, fueron ajustados respectivamente y utilizados. El guion significa que la estimación de los parámetros térmicos de población no fue posible debido a la muy baja germinación durante la prueba inicial (germinación observada <2%). El valor de RMSE fue calculado como un estimador de la bondad del ajuste entre los valores de germinación observados y simulados (Ecn. 2.6).....**Pag. 24**

**Cuadro 2.2** Estimación de los parámetros térmicos para la población de semillas de *P. aviculare* durante la inducción en dormición secundaria a diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25 y 30 °C). Los parámetros térmicos ( $T_{l(50)}$ ,  $\sigma_{Tl}$ ,  $T_{h(50)}$ ,  $\sigma_{Th}$ ) se obtuvieron a partir de datos de germinación obtenidos experimentalmente a temperaturas constantes de 10 y 15 °C mediante el ajuste de las curvas de germinación simuladas para las semillas que han sido inducidas en dormición secundaria a las diferentes temperaturas (10 – 30 °C) y diferentes días. La simulación se realizó utilizando la ecuación descrita en el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Se asumió que los valores de  $T_b$ ,  $T_o$  y  $T_m$  no variaron durante la inducción en dormición secundaria, los valores se fijaron en 0, 25 y 35 °C, respectivamente, luego fueron utilizados. El día 0 representa el punto con el mínimo nivel de dormición al momento de la inducción. El valor de RMSE fue calculado como un estimador de la bondad del ajuste entre los valores de germinación observados y simulados (Ecn. 2.6).....**Pag. 26**

**Cuadro 2.3** Estimación de los parámetros térmicos de la población de semillas para *P. aviculare* al final del período de estratificación a las diferentes temperaturas (0 días, representa el punto con el mínimo nivel de dormición ( $S_{tt} = 1500 \text{ °Cd}$ )) y durante la inducción en dormición secundaria a 20 °C (2 y 4d). Los parámetros térmicos ( $T_{l(50)}$ ,  $\sigma_{Tl}$ ,  $T_{h(50)}$ ,  $\sigma_{Th}$ ) se obtuvieron a partir de datos de germinación obtenidos experimentalmente a temperaturas constantes de 10 °C (panel **a**) y 15 °C (panel **b**) mediante el ajuste de las curvas de germinación simuladas para las semillas que han sido inducidas en dormición secundaria a 20 °C. La simulación se realizó utilizando la ecuación descrita en el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). El valor de RMSE fue calculado como un estimador de la bondad del ajuste entre los valores de germinación observados y simulados (Ecn. 2.6).....**Pag. 29**

**Cuadro 3.1** Valores de pendiente y ordenada al origen de las ecuaciones lineales de  $T_{l(50)}$  en función del tiempo de estratificación ( $S_{tt}$ ) para distintos contenidos hídricos en las semillas (*CHS*). Las ecuaciones lineales fueron desarrolladas de acuerdo a la función lineal:  $Y = a \cdot X + b$ ; donde  $a$  es la pendiente de la función,  $X$  es el tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y  $b$  es ordenada al origen.  $R^2$  es el coeficiente de determinación del ajuste del modelo de regresión lineal.....**Pag. 46**

**Cuadro 3.2** Valores de pendiente y ordenada al origen de las ecuaciones lineales de  $T_{l(50)}$  en función del tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) para distintos contenidos hídricos en las semillas ( $CHS$ ). Las ecuaciones lineales fueron desarrolladas de acuerdo a la función lineal:  $Y = a \cdot X + b$ ; donde  $a$  es la pendiente de la función,  $X$  es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) y  $b$  es ordenada al origen.  $R^2$  es el coeficiente de determinación del ajuste del modelo de regresión lineal.....**Pag. 50**

**Cuadro 3.3** Valores estimados de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ), temperatura del límite inferior del rango térmico permisivo para la germinación ( $T_{l(50)}$ ), contenido hídrico en las semillas ( $CHS\%$ ), desviación standard de la temperatura del límite inferior del rango térmico permisivo para la germinación ( $\sigma_{Tl}$ ), para diferentes exhumaciones a campo realizadas en el 2015. Los valores en color rojo indican que la población de semillas se encuentra completamente dormida.....**Pag. 52**

**Cuadro 5.1** Valores estimados de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ), temperatura del límite inferior del rango térmico permisivo para la germinación ( $T_{l(50)}$ ), contenido hídrico en las semillas ( $CHS\%$ ), desviación standard de la temperatura del límite inferior del rango térmico permisivo para la germinación ( $\sigma_{Tl}$ ), parámetros que determinan la respuesta de la población de semillas a los ciclos de fluctuaciones térmicas ( $C$  y  $K$ ), porcentajes de la población de semillas que presentan respuesta de tipo LFR, VLFR y que son capaces de germinar en ausencia de luz (OSC), para diferentes fechas de siembra durante el año y diferentes condiciones de temperatura y contenido hídrico en las semillas. Las líneas representan; sin valores de  $T_{l(50)}$  para esas fecha de siembra.....**Pag. 89**

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.1** Cambios estacionales en el rango de temperaturas permisivo para la germinación y su relación con la dinámica de la temperatura del suelo. Las líneas punteadas finas y las líneas gruesas indican la temperatura del límite inferior ( $T_l$ ) y temperatura del límite superior ( $T_h$ ) del rango permisivo para la germinación. La línea continua indica la temperatura del suelo ( $T^o$ ). El área sombreada representa el periodo en el cual ocurre la germinación en el campo. a) Para una especie anual estival y b) para una especie anual invierno-facultativa (adaptado de Probert, 1992)..... **Pag. 4**

**Figura 1.2** Espectro de absorción de las dos formas del fitocromo (Pr y Pfr). Estas diferencias en la absorción hicieron posible el aislamiento del fitocromo. (Figura modificada de Salisbury, F.B. y Ross, C.W., 1991. "Plant Physiology", 2nd ed., Wadsworth Publishing Company)..... **Pag. 6**

**Figura 1.3** Especie modelo primavera-estival *Polygonum aviculare* L. (Sanguinaria o cien nudos). **a)** Las semillas son aquenios ovoides, trógonos de 2 a 3 mm de largo, color moreno-rojizo hasta casi negros. **b)** Plántulas emergidas de *P. aviculare*. **c)** Planta adulta herbácea, con tallos delgados, estriados, simples hasta muy ramificados que forman matas postradas de aproximadamente 1 m de diámetro y hasta 50 cm de altura. **d)** Flores axilares, solitarias o agrupadas en glomérulos, perianto verdoso con márgenes blanquecinos o rosados.....**Pag. 10**

**Figura 2.1** Curvas de germinación acumulada observada a temperaturas de incubación de 10 °C (**a, b, c**) y 15 °C (**d, e y f**) para semillas de *P. aviculare* estratificadas a 1,6 °C (○), 5 °C (□) y 10 °C (Δ) que habían acumulado diferentes cantidades de tiempo térmico de estratificación: 500 °Cd (**a, d**), 1000 °Cd (**b, e**) y 1500 °Cd (**d, f**). Las líneas continuas y punteadas representan las curvas de germinación simuladas usando las ecuaciones descritas para el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo..... **Pag. 23**

**Figura 2.2** Semillas de *P. aviculare* inducidas en dormición secundaria. Curvas de germinación simuladas (línea punteada) y observadas (símbolos) de semillas incubadas a temperaturas constantes de 10 °C (○) y 15 °C (Δ) después de diferentes días de inducción en dormición secundaria a 10 °C (**a, b, c, d**), 15 °C (**e, f, g, h**), 20 °C (**i, j, k, l**), 25 °C (**m, n, o, p**) y 30 °C (**q, r, s**). Previamente a la inducción en dormición las semillas fueron estratificadas a 5 °C durante 125 días ( $S_{tt} = 1500$  °Cd) hasta obtener un mínimo de dormición. Los datos de germinación fueron simulados utilizando las ecuaciones del modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no se muestran las barras se muestra que el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo..... **Pag. 25**

**Figura 2.3** Representación de los valores de la temperatura del límite inferior ( $T_{l(50)}$ ) para semillas de *P. aviculare* inducidas en dormición a diferentes temperaturas 10 °C (○), 15 °C (□), 20 °C (Δ), 25 °C (▽) y 30 °C (◇) (derivado de las curvas simuladas mostradas en la Fig. 2.2), en función de los días de inducción (**a**), y en función del tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) (**b**). Las líneas punteadas en (**a**) se ajustaron mediante ecuaciones lineales para cada temperatura de almacenamiento con valores de  $R^2$  de 0,96

(10 °C), 0,99 (15 °C), 0,87 (20 °C), 0,89 (25 °C) y 0,96 (30 °C), respectivamente (*P-value* = < 0.0001, test de pendientes, para verificar que las pendientes son significativas diferentes). La bi-lineal ajustada en (b) es el resultado de un análisis de repetidas regresiones para obtener la 'temperatura de inducción en dormición umbral' ( $T_{uDI}$ ) con el mejor ajuste de acuerdo a la ecuación (2.7). Los valores de los parámetros correspondientes a la ecuación (2.8) son la pendiente ( $T_{l(50)}$  tasa de incremento) =  $0,12 \pm 0,0179$  °C por °Cd y la intersección del eje y (inicial  $T_{l(50)}$  de la población de semillas con mínima dormición) =  $7,5 \pm 0,7$  °C..... **Pag. 27**

**Figura 2.4** Porcentajes de germinación final predichos (líneas) y observados (símbolos) a temperaturas de incubación de 10 °C (a) y 15 °C (b) para semillas de *P. aviculare* previamente estratificadas a 1,6 °C (○), 5 °C (□) y 10 °C (Δ) ( $S_{tt} = 1500$  °Cd) y después expuestas a 20 °C durante 20d. Los valores predichos fueron simulados utilizando las ecuaciones descritas en el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5) para temperaturas de almacenamiento de 1,6 °C (línea continua), 5 °C (línea discontinua) y 10 °C (línea de puntos). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) y donde no se muestran las barras se muestra que el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo..... **Pag. 28**

**Figura 2.5** Curvas de germinación simuladas con curvas obtenidas a partir de datos experimentales durante la inducción en dormición secundaria a 20 °C para semillas de *P. aviculare* previamente estratificadas a 1,6 °C (○), 5 °C (□) y 10 °C (Δ). Curvas de germinación simuladas (línea continua y discontinua) y observadas (símbolos) para semillas de *P. aviculare* incubadas a 10 °C (a, b, c) y 15 °C (d, e y f) después de haber sido expuestas a 20 °C durante 0, 2 y 4d. Los valores predichos fueron simulados utilizando las ecuaciones descritas en el modelo desarrollado por la germinación Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) y donde no se muestran las barras se muestra que el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.....**Pag. 30**

**Figura 2.6** Cambios en la distribución de la frecuencia normal de  $T_{l(50)}$  dentro de una población de semillas de *P. aviculare* previamente estratificadas a 1,6 °C (a, b), 5 °C (c, d) y 10 °C (e, f) hasta alcanzar un mínimo nivel de dormición ( $S_{tt} = 1500$  °Cd) y, posteriormente, inducidas en dormición secundaria a 20 °C durante 0, 2 y 4d. Los valores estimados para los parámetros térmicos ( $T_{l(50)}$  y  $\sigma_{Tl}$ ) se obtuvieron a través de la reproducción mediante la simulación de las curvas de germinación para las semillas expuestas a 20 °C y después incubadas a temperaturas constantes de 10 °C (línea vertical discontinua) o 15 °C (línea vertical discontinua). El valor inicial de  $T_{l(50)}$  antes de exponerlas a 20 °C fue de 7,5 °C para las semillas estratificadas a todas las temperaturas. El valor inicial de  $\sigma_{Tl}$  era  $\sigma_{Tl} = 1,5$ ,  $\sigma_{Tl} = 4$  y  $\sigma_{Tl} = 5,2$  para las semillas estratificadas a 1,6 °C, 5 °C y 10 °C, respectivamente, y se asume que no cambian a lo largo de la inducción en dormición secundaria.....**Pag. 31**

**Figura 3.1** Evolución del contenido hídrico en las semillas (*CHS%*) de *P. aviculare* durante el tiempo de estratificación (5 °C) bajo diferentes condiciones de HR. Los símbolos corresponden a los valores medios de *CHS* y las barras corresponden al error estándar ( $\pm SE$ ). Cuando el SE no se ve es porque el error es menor que el tamaño del símbolo.....**Pag. 39**

**Figura 3.2** Evolución del contenido hídrico en las semillas (*CHS%*) de *P. aviculare* durante la inducción en dormición secundaria a 20 °C bajo diferentes condiciones de HR. Los símbolos corresponden a los valores medios de *CHS* y las barras corresponden al error estándar ( $\pm$ SE). Cuando el SE no se ve es porque el error es menor que el tamaño del símbolo.....**Pag. 40**

**Figura 3.3** Curvas de germinación obtenidas a temperaturas de incubación de 15 °C para semillas de *P. aviculare* con distinto contenido de humedad estratificadas a 5 °C que habían acumulado diferentes cantidades de tiempo térmico de estratificación: 0 °Cd (a), 240 °Cd (b), 480 °Cd (c), 720 °Cd (d), 960 °Cd (e) y 1200 °Cd (f). Los símbolos vacíos representan los porcentajes de germinación obtenidos a 15 °C y las líneas continuas de colores representan las curvas de germinación simuladas usando las ecuaciones descritas en el Capítulo 2 para el modelo de Washitani. Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo.....**Pag. 44**

**Figura 3.4 (a)** Porcentajes finales de germinación en función de los diferentes contenidos hídricos para semillas de *P. aviculare* estratificadas a 5 °C durante 100 días. A partir del 15% de *CHS* se promueve el efecto de la estratificación sobre la salida de la dormición primaria, semillas con *CHS* por debajo de 15% se mantienen dormidas (línea vertical punteada marca el umbral). Los símbolos representan el porcentaje de germinación obtenido para cada condición de *CHS*. Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo. **(b)** Estimación de los valores de la temperatura del límite inferior ( $T_{l(50)}$ ) para semillas de *P. aviculare* incubadas a 15 °C (derivado de las curvas simuladas mostradas en la Fig. 3.3), en función de los días de estratificación y los diferentes *CHS*. Valores estimados para  $T_{l(50)}$  a partir del *CHS* de 15% se obtuvieron en función de la acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) de acuerdo con la ecuación (3.2). Las líneas de puntos se ajustaron mediante ecuaciones lineales para cada contenido hídrico, con valores de  $R^2$  de 0,98 (22% *CHS*), 0,99 (29,8% *CHS*), 0,98 (35,4% *CHS*), y 0,97 (45,7% *CHS*), respectivamente ( $P$ -value = < 0.0001, test de pendientes, para verificar que las pendientes son significativas diferentes.....**Pag. 45**

**Figura 3.5** Modelo propuesto en base a la relación entre los cambios en  $T_{l(50)}$  de la población de semillas y las unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) en función del *CHS* (%) en semillas de *P. aviculare*. El modelo bi-lineal representa la tasa de salida de la dormición primaria (disminución de la  $T_{l(50)}$  por unidad de tiempo térmico de estratificación acumulado ( $S_{tt} = \text{°Cd}$ )) en función del contenido hídrico en la semilla. La línea de puntos vertical representa el valor umbral de contenido hídrico de las semillas por encima del cual la estratificación promueve la salida de la dormición primaria, el modelo toma como base un contenido umbral de contenido hídrico de 15% de humedad en la semilla para que el proceso de estratificación tenga lugar. La segunda línea vertical de puntos tenues representa el valor óptimo de *CHS* para la salida de la dormición (31%)..... **Pag. 46**

**Figura 3.6** Curvas de germinación acumulada observada obtenidas a temperatura constante de 15 °C para semillas de *P. aviculare* con distinto contenido de humedad durante la inducción en dormición secundaria a 20 °C. Cada panel corresponde al día de inducción en dormición secundaria: (a) día 0, (b) día 2, (c) día 4, (d) día 6, (e) día 8 y (f) día 12. Los símbolos (vacíos y llenos) representan los porcentajes de germinación

obtenidos a 15 °C y las líneas continuas representan las curvas de germinación simuladas usando las ecuaciones descritas para el modelo de germinación desarrollado (Capítulo 2). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo..... **Pag. 48**

**Figura 3.7 (a)** Porcentajes de germinación obtenidos en función de los diferentes contenidos hídricos en semillas de *P. aviculare* inducidas en dormición secundaria a 20 °C durante 12 días. Los símbolos y las líneas continuas representan los días durante la inducción en dormición secundaria. La figura pequeña superior izquierda es una ampliación del día 0 antes de inducir las semillas en dormición secundaria. La barra vertical gris indica el porcentaje de germinación obtenido para una población con poca dormición ( $\approx$ 1200 °Cd de  $S_{tt}$  sin restricción hídrica) (Germinación = 68%, punto gris en el eje de abscisas  $y$ ), las barras en rojo indican los porcentajes de germinación obtenidos en el día 0 debido a los diferentes *CHS* antes de ser inducidas en dormición secundaria a 20 °C. Las barras verticales en ambas figuras indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo. **(b)** Cambios en la  $T_{l(50)}$  en función de los contenidos hídricos de las semillas durante el tiempo de inducción en dormición secundaria a 20 °C. Las líneas discontinuas se ajustaron mediante ecuaciones lineales para cada contenido hídrico, con valores de  $R^2$  de 0,95 (14% *CHS*), 0,96 (17% *CHS*), 0,96 (19% *CHS*), 0,90 (24%), 0,87 (33% *CHS*) y 0,83 (41% *CHS*), respectivamente ( $P$ -value = < 0.0001, test de pendientes, para verificar que las pendientes son significativas diferentes)..... **Pag. 49**

**Figura 3.8** Estimación de los valores para el ajuste del modelo a partir de la temperatura del límite inferior ( $T_{l(50)}$ ) y la acumulación de  $DI_{tt}$  para semillas de *P. aviculare* (valores derivados de las curvas simuladas mostradas en la Fig. 3.6) en función de los días de inducción en dormición secundaria y los diferentes contenidos hídricos obtenidos en las semillas. Modelo propuesto sobre la base de la relación entre los parámetros de dormición ( $T_{l(50)}$ ) de la población de semillas y las unidades de tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) en función del *CHS*. Las líneas de puntos verticales representan el valor umbral a partir del cual la entrada en dormición secundaria tiene lugar (15%) y la tasa con la cual son inducidas es dependiente del *CHS*. Por encima de 31% *CHS* la tasa de inducción en dormición es máxima..... **Pag. 51**

**Figura 3.9** Porcentajes de germinación obtenidos en dos condiciones: i) condiciones controladas (incubadas a 15 °C) y ii) en condiciones de campo para semillas de *P. aviculare*, enterradas en el suelo a finales de marzo del 2015 (dispersión natural en marzo) hasta finales de primavera (otoño, invierno y primavera). La línea negra punteada representa la germinación predicha en función del *CHS*, la línea roja punteada representa la germinación predicha sin restricción hídrica. Germinación observada (círculos) en condiciones controladas y germinación obtenida en condiciones de campo (cuadros). La línea punteada vertical en 04/08/2015 indica el momento en que la población de semillas se induce en dormición secundaria. La figura superior representa las condiciones de temperatura y contenido hídrico medio durante el experimento a campo. Los datos de germinación se simularon utilizando ecuaciones del modelo de salida ( $S_{tt}$ , Batlla y Benech-Arnold, 2003) y entrada en dormición secundaria ( $DI_{tt}$ , índice desarrollado en el capítulo 2), utilizando las ecuaciones (3.1 – 3.4) y las variables derivadas de los modelos (Fig 3.5 y Fig.3.8). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo..... **Pag. 53**

**Figura 4.1** Porcentajes de germinación observados y simulados para las semillas de *P. aviculare* durante la salida de la dormición primaria en relación con la acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt} = 0, 500, 1000$  y  $1500$  °Cd) (Batlla y Benech-Arnold, 2003). Los símbolos representan los porcentajes de germinación observados para las semillas estratificadas a  $5$  °C, expuestas a los diferentes tratamientos lumínicos de Pfr/Pt: 76% (círculos); 3% cuadrados);  $7.6 \times 10^{-4}\%$  (triángulos); y para semillas mantenidas en oscuridad (triángulos invertidos). Las líneas representan valores simulados para Pfr/Pt de 76% (línea continua), 3% y  $7.6 \times 10^{-4}\%$  (línea punteada) y semillas mantenidas en oscuridad (línea discontinua). Los modelos presentaron los siguientes  $R^2$ : Pfr/Pt de 76% = 0,91, Pfr/Pt de 3% y  $7.6 \times 10^{-4}\%$  = 0,97 y OSC (oscuridad) = 0,92. Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) y donde no se muestran barras, el SE de la media es menor que el tamaño del símbolo..... **Pag. 66**

**Figura 4.2** Porcentajes de germinación obtenidos a  $15$  °C en semillas de *P. aviculare* en respuesta a diferentes foto-equilibrios: Pfr/Pt: 76% (a); 3% (b);  $7.6 \times 10^{-4}\%$  (c); y para las semillas mantenidas en la oscuridad (d), en relación con el tiempo de inducción en dormición secundaria a las siguientes temperaturas:  $10$  °C (círculos);  $15$  °C (cuadrados);  $20$  °C (triángulos) y  $25$  °C (triángulos invertidos). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) y donde no se muestran barras, el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo..... **Pag. 67**

**Figura 4.3** Porcentaje de germinación para semillas de *P. aviculare* en relación con el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) (índice desarrollado en el Capítulo 2) para semillas expuestas a  $10$  °C (círculos),  $15$  °C (cuadrados),  $20$  °C (triángulos) y  $25$  °C (triángulos invertidos) en respuesta a diferentes tratamientos de luz: (a) tratamiento 1: Pfr/Pt = 76%; (b) tratamiento 2: Pfr/Pt = 3% (símbolos abiertos) y tratamiento 3: Pfr/Pt =  $7.6 \times 10^{-4}\%$  (símbolos cerrados) y (c) tratamiento 4: Semillas mantenidas en la oscuridad. Las líneas continuas en los paneles (a – c) corresponden al ajuste de los modelos bi-lineales con  $R^2 = 0,82, 0,70$  y  $0,78$ , respectivamente. Las líneas punteadas verticales indican que por encima de los  $DI_{tt} = 100$  °Cd, no hay más entrada en dormición (dormición absoluta). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) y donde no se muestran barras, el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo..... **Pag. 70**

**Figura 4.4** Porcentajes de germinación observados y simulados para semillas de *P. aviculare* en función de la acumulación de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) durante la salida de la dormición primaria (modelo desarrollado por Batlla y Benech-Arnold, 2005) y tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) durante la entrada en dormición secundaria (índice desarrollado en el Capítulo 2) para semillas enterradas en el suelo. La línea punteada vertical indica fin de salida/inicio de entrada en dormición. Los símbolos representan los porcentajes de germinación observados para semillas enterradas en el campo (otoño, invierno y principios de primavera) expuestas a los siguientes tratamientos: (1) Pfr/Pt = 76% (círculos); (2) Pfr/Pt = 3% (cuadrados) y (3) semillas mantenidas en la oscuridad (triángulos). La línea roja llena representa la germinación predicha por la simulación para valores de Pfr/Pt de 76%, 3% (línea punteada) y oscuridad (línea punteada negra) en función de las unidades térmicas acumuladas para  $S_{tt}$  y  $DI_{tt}$ . Los porcentajes de germinación predichos fueron simulados utilizando las ecuaciones (4.1, 4.3 – 4.8), en función de la temperatura experimentada por las semillas en el campo. Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) y donde no se muestran barras, el SE de la media es menor que el tamaño del símbolo..... **Pag. 71**

**Figura 4.5** Curvas de respuesta de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas durante diferentes tiempos de  $S_{tt}$  ((a) 0, (b) 500, (c) 1000 y (d) 1500 °Cd) estratificadas a 5 °C (Batlla y Benech-Arnold, 2003). Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo..... **Pag. 72**

**Figura 4.6** Porcentajes de germinación simulados predichos (líneas) y observados (símbolos vacíos) de semillas de *P. aviculare* expuestas a 0, 1, 3, 5 y 15 ciclos de 10/24 °C (12/12 hs) en relación al tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) acumulado durante la salida de la dormición primaria. Los datos corresponden a semillas estratificadas a 5 °C en condiciones controladas. Los porcentajes de germinación fueron simulados utilizando las ecuaciones derivadas por Batlla et al. (2003) en relación a los valores acumulados de  $S_{tt}$ . Las líneas corresponden a la ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ , ajustada a los datos simulados (símbolos llenos) ( $R^2 = 0,85$ ), cada línea corresponde un número de ciclos (1 ciclo = línea continua - punteada, 3 ciclos = línea punteada, 5 ciclos = línea continua y 15 ciclos = línea llena).  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) de los datos obtenidos en forma experimental. En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo..... **Pag. 73**

**Figura 4.7** Curvas de respuesta de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas luego de diferentes días durante la inducción en dormición secundaria a una temperatura de 10 °C: a = 0 días, b = 6 días, c = 11 días, d = 16 días, e = 26 días y f = 36 días. Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo..... **Pag. 74**

**Figura 4.8** Curvas de respuesta de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas luego de diferentes días durante la inducción en dormición secundaria a una temperatura de 15 °C: a = 0 días, b = 5 días, c = 10 días, d = 15 días, e = 25 días y 32 días. Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo..... **Pag. 75**

**Figura 4.9** Curvas de respuesta de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas luego de diferentes días durante la inducción en dormición secundaria a una temperatura de 20 °C: a = 0 días, b = 2 días, c = 4 días, d = 8 días, e = 14 días y f = 20 días. Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un porque el SE es menor que el símbolo..... **Pag. 76**

**Figura 4.10** Curvas de respuesta régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas luego de diferentes días durante la inducción en dormición secundaria a una temperatura de 25 °C: a = 0 días, b = 1 días, c = 3 días, d = 7 días, e = 12 días y f = 16 días. Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo..... **Pag. 77**

**Figura 4.11** Dinámica de los coeficientes C y K en relación al tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Los valores de C y K corresponden a las curvas de

respuesta de la germinación ( $Y_X = C \cdot (1 - \exp(K \cdot X)) + Y_0$ ) de semillas de *P. aviculare* al número de ciclos de un régimen de temperatura fluctuante de 10/24 °C (12/12 hs) determinadas para diferentes valores de  $DI_{tt}$ . Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los siguientes modelos bilineales:  $C = 16,62 + 0,368 \cdot DI_{tt}$ , si ( $DI_{tt} \leq 103,1$ );  $C = 48,6 - 0,124 \cdot (DI_{tt} - 103,1)$ , si ( $DI_{tt} > 103,1$ ), y  $K = 0,040 + 0,0075 \cdot DI_{tt}$ , si ( $DI_{tt} \leq 62$ );  $K = 0,51 - 0,0011 \cdot (DI_{tt} - 62)$ , si ( $DI_{tt} > 62$ ).....**Pag. 78**

**Figura 4.12** Porcentajes de germinación simulados (símbolos llenos) y observados (símbolos vacíos) de semillas de *P. aviculare* expuestas a 0, 5, 10 y 15 ciclos de 10/24 °C (12/12 hs) en relación al tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) acumulado durante la salida e inducción en dormición secundaria. Los datos corresponden a semillas enterradas en el campo (círculos vacíos) y porcentajes de germinación predichos por los modelos (círculos llenos). Previamente a ser expuestas a los diferentes ciclos de 10/24 °C, las semillas fueron incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Los paneles (a, b, c y d) corresponden a la salida de la dormición primaria y los paneles (e y f) a la entrada en dormición secundaria. Los porcentajes de germinación fueron simulados utilizando las ecuaciones (4.3, 4.9 - 4.12) en relación a los valores acumulados de  $S_{tt}$  y  $DI_{tt}$  calculados utilizando la ecuación (4.9). La línea punteada corresponde a la ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ , ajustada a los datos simulados (símbolos llenos) ( $RMSE = 3,1$  (b),  $RMSE = 10,3$  (c),  $RMSE = 9,3$  (d),  $RMSE = 4,2$  (e),  $RMSE = 9,5$  (f), respectivamente).  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) de los datos obtenidos en forma experimental. En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo.....**Pag. 79**

**Figura 5.1** Diagrama de flujo representando los cambios en el nivel de dormición, la terminación de la dormición y la germinación en las poblaciones de semillas y los factores ambientales más relevantes en la regulación de cada proceso (Adaptado de Benech-Arnold et al., 2000).....**Pag. 88**

**Figura 5.2** Temperatura y contenido hídrico en las semillas ( $CHS\%$ ) registrados a 5 cm de profundidad en el campo durante un año cálido - seco y un año frío - húmedo. Las letras y las flechas indican el momento en el que se realizará la labor de labranza en el campo. La línea roja continua representa la temperatura para un año cálido y la línea roja continua representa un año frío. La línea azul discontinua representa un año húmedo (altos niveles de hidratación en las semillas) y la línea negra punteada representa un año seco (bajos niveles de hidratación en las semillas). Las líneas verticales discontinuas representan el cambio de una estación a otra.....**Pag. 90**

## SIGLAS Y ABREVIATURAS UTILIZADAS

Sigla/Abreviatura	Significado	Unidad
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Nitrato de Calcio	g/mol
CHS	Contenido hídrico en la semilla	%
D	Tiempo térmico diferencial para la germinación del 0 al 50% de la población	°C día
DI <sub>tt</sub>	Tiempo Térmico de Inducción en Dormición (del inglés, Dormancy Induction thermal time)	°C día
G	Germinación	%
g	Fracción de individuos de la población	°C día
G <sub>n</sub>	Porcentaje de germinación obtenido en respuesta a n ciclos de temperatura fluctuante	%
G <sub>o</sub>	Porcentaje de germinación para semillas incubadas a temperatura constante	%
HR	Humedad Relativa	%
HIR	Respuesta de alta irradiancia ( <i>High Irradiance Response</i> )	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
H <sub>2</sub> O	Óxido de Hidrogeno	g/mol
KCl	Cloruro de Potasio	g/mol
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de Potasio	g/mol
Lat	Latitud	°
LFR	Respuestas a flujos bajos ( <i>Low Fluence Response</i> )	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
LiCl	Cloruro de Litio	g/mol
Long	Longitud	°
m	Mediana de la distribución	°C día
N	Número de ciclos de fluctuación de temperatura	----

<b>Sigla/Abreviatura</b>	<b>Significado</b>	<b>Unidad</b>
NaCl	Cloruro de Sodio	g/mol
OSC	Oscuridad	----
Pfr	Proporción del fitocromo con un máximo de absorción en la región del espectro ca. 730nm	----
Pfr/Pt	Fitocromo total, Pr+Pfr	----
PHYA-E	Fitocromos A – E (Fitocromos encontrados en <i>Arabidopsis thaliana</i> )	----
Pr	Proporción del fitocromo con un máximo de absorción en la región del espectro 660 nm	----
R	Luz Roja	nm
<i>r</i>	Tasa de germinación	1/d
$R^2$	Coefficiente de correlación	----
RL	Luz roja lejano	Nm
RMSE	del inglés, Root Mean Squared Error	----
$S_{tt}$	Tiempo Térmico de Estratificación (del inglés, Stratification thermal time)	°C día
<i>t</i>	Tiempo	Horas/días
<i>T</i>	Temperatura	°C
$T_c$	Temperatura umbral para la salida de la dormición primaria	°C
$T_b$	Temperatura base	°C
$T_h$	Temperatura del límite superior del rango permisivo para la germinación	°C
$T_{h(50)}$	Temperatura del límite superior del rango permisivo para la germinación del 50 % de la población de semillas	°C
$T_l$	Temperatura del límite inferior del rango permisivo para la germinación	°C

<b>Sigla/Abreviatura</b>	<b>Significado</b>	<b>Unidad</b>
$T_{l(50)}$	Temperatura del límite inferior del rango permisivo para la germinación del 50 % de la población de semillas	°C
$T_o$	Temperatura óptima	°C
$T_s$	Temperatura media diaria de almacenaje	°C
$T_{UDI}$	Temperatura umbral para la inducción en dormición secundaria	°C
VLFR	Respuestas a flujos muy bajos ( <i>Very Low Fluence Response</i> )	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
$W_s$	Peso seco de la semilla	g
$W_w$	Peso fresco de la semilla	g
$\text{ZnCl}_2$	Cloruro de Zinc	g/mol
$\Delta T_{l(50)} / \Delta D I_{tt}$	Tasa de cambio de $T_{l(50)}$ por unidad de tiempo térmico de inducción en dormición $D I_{tt}$	1/d
$\Delta T_{l(50)} / \Delta S_{tt}$	tasa de cambio de $T_{l(50)}$ por unidad de tiempo térmico de inducción en dormición $S_{tt}$	1/d
$\theta$	Tiempo térmico requerido para la germinación de la población de semillas	°C día
$\theta_{(50)}$	Tiempo térmico requerido para que germine el 50% de la población	°C día
$\sigma_{Th}$	Desviación standard de $T_h$	°C
$\sigma_{Th(50)}$	Desviación standard de $T_h$ , para el 50% de la población	°C
$\sigma_{Tl}$	Desviación standard de $T_l$	°C
$\sigma_{Tl(50)}$	Desviación standard de $T_l$ , para el 50% de la población	°C

## **Regulación ambiental de los cambios en el nivel de dormición durante la salida de la dormición primaria y la entrada en dormición secundaria en semillas de *Polygonum aviculare* L.: el papel de la temperatura y la disponibilidad hídrica del suelo**

### **RESUMEN**

La temperatura del suelo es considerada como el primer factor ambiental que regula cambios en el nivel de dormición en el banco de semillas. Este efecto sobre los cambios cíclicos de salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria es muchas veces modulado por el contenido hídrico del suelo. En el presente trabajo se estudió los procesos de salida de dormición primaria, inducción y expresión de la dormición secundaria en semillas de *Polygonum aviculare* (una maleza anual de emergencia primavera-verano) en función del ambiente térmico e hídrico. Para ello, se llevó a cabo la siguiente metodología: semillas de *P. aviculare* fueron enterradas en macetas, estratificadas durante la salida de la dormición primaria a 1.6, 5 y 10 °C, y para inducir las a dormición secundaria fueron almacenadas a altas temperaturas (es decir, 10 – 30 °C) y también con diferentes contenidos hídricos de las semillas (es decir, 7 - 61 %). Durante el tiempo de estratificación y el tiempo de inducción en dormición, se extrajeron grupos de semillas y se cuantificó el efecto de la temperatura sobre la tasa de salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria a través de cambios en el rango de temperatura permisiva para la germinación de semillas determinado por los parámetros  $T_l$  (temperatura del límite inferior) y  $T_h$  (temperatura del límite superior). Luego, se cuantificó el efecto del contenido hídrico durante la salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria. Finalmente, se cuantificaron los cambios en la sensibilidad a las fluctuaciones de temperatura y a la luz durante la inducción en dormición secundaria. Los resultados mostraron que la tasa de inducción en dormición secundaria no solo depende de la temperatura imperante, sino también de la temperatura experimentada previamente por las semillas durante la salida de la dormición y el nivel de dormición de la población de semillas. Por otro lado, se demostró que no solo la temperatura tiene un efecto sobre los cambios en el nivel de dormición (salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria), sino que también el contenido hídrico en los bancos de semillas jugaría un papel importante como modulador de estos cambios dependiendo del nivel de hidratación de las semillas y la temperatura predominante. A su vez, los cambios en la sensibilidad a la luz y a las temperaturas fluctuantes durante la inducción en dormición secundaria dependen de la temperatura que modifica el nivel de dormición de la población de semillas. Finalmente, en función de la cuantificación de las relaciones encontradas, se desarrollaron modelos matemáticos para predecir los cambios en el nivel de dormición de la población de semillas enterradas en el suelo. Sobre la base de los resultados obtenidos, se logró un mayor entendimiento de la forma en que los factores del ambiente regulan la dormición de las semillas en los bancos de semillas del suelo.

**Palabras clave:** disponibilidad hídrica, dormición primaria, dormición secundaria, germinación, luz, *Polygonum aviculare*, temperatura, tiempo térmico.

## **Environmental regulation in dormancy level during primary dormancy release and secondary dormancy induction in *Polygonum aviculare* L. seeds: the role of temperature and soil water availability**

### **ABSTRACT**

Soil temperature is considered the main environmental factor regulating changes in dormancy in the soil seed-bank. This effect on changes in primary dormancy release and induction into secondary is often modulated by soil water content availability. In the present work we studied the processes of primary dormancy release, induction and expression of the secondary dormancy in *Polygonum aviculare* seeds (a spring-summer annual weed) depending on the thermal and water environment. With this objective, we did the following: *P. aviculare* seeds were buried in pots, stratified during dormancy release at 1.6, 5 and 10 °C. Then, to induce them into secondary dormancy the seeds were stored at high temperatures (i.e. 10 to 30 °C) and under different water contents. During the period of stratification (dormancy release) and induction into secondary dormancy, groups of seeds were removed from the pots and the effect of temperature on dormancy induction rate was measured through changes in the temperature range permissive for seed germination determined by  $T_l$  (lower temperature limit) and  $T_h$  (higher temperature limit). Then, the effect of seed water content on primary dormancy release and induction into secondary dormancy was assessed and finally, changes in seed sensitivity to fluctuating temperature and light during dormancy induction, was quantified. The results showed that the effect of temperature on the rate of dormancy induction is not only dependent on prevailing temperature, but also on temperature experienced by seeds during previous dormancy release and the resulting dormancy status of the seed population. On the other hand, it was demonstrated that not only the temperature has an effect on the changes in the dormancy level (primary dormancy release and subsequent induction into secondary dormancy), but also the water content in the seed banks would play an important role as modulator of these changes depending on the hydration level of the seeds and the prevailing temperature. In turn, changes in sensitivity to light and fluctuating temperatures during induction into secondary dormancy depends on the temperature that modifies the dormancy level of the seed population. Finally, based on the quantification of the relationships found, mathematical models were developed to predict the changes in the dormancy level of the seed population buried in the soil. Based on the results obtained, an in-depth understanding was achieved about how environmental factors regulates seed dormancy in soil seed-banks.

**Key-words:** *germination, light, Polygonum aviculare, primary dormancy, secondary dormancy, temperature, thermal time, water availability.*

**Regulación ambiental de los cambios en el nivel de dormición durante la salida de la dormición primaria y la entrada en dormición secundaria en semillas de *Polygonum aviculare* L.: el papel de la temperatura y la disponibilidad hídrica del suelo**



# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL: REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA**



## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUCCIÓN GENERAL: REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

#### 1.1 Concepto y definición de Maleza

El concepto de maleza surge desde los inicios de la agricultura. Sin embargo, no ha sido fácil poder definir las malezas como una categoría única, por lo que han surgido diversas definiciones entre los investigadores (Satorre et al., 2016). Si bien las definiciones pueden ser diversas, un concepto común puede definir a las malezas como: plantas que crecen y se desarrollan donde se desea que crezcan otras plantas o eventualmente, ninguna (Radosevich et al., 2007; Guglielmini et al., 2007). Más allá de las características biológicas o ecológicas, las definiciones suelen enfatizar directa o indirectamente su papel negativo basándose en un enfoque antropocéntrico. Desde esta perspectiva, una planta es una maleza no por poseer determinados atributos biológicos y ecológicos, sino más bien por interferir con las actividades del hombre (Harlan y de Wet, 1963). En los sistemas agrícolas, esta perspectiva es la que predomina ya que, las malezas constituyen una limitación importante en la mayoría de los sistemas cultivados en todo el mundo (Scursoni et al., 2007).

Muchas plantas tradicionalmente clasificadas como malezas también pueden ser utilizadas para fines alimenticios o medicinales, como por ejemplo: *Chenopodium album* (Quínoa), *Amaranthus hybridus* L. (Amaranto), *Portulaca oleracea* L. (Verdolaga), *Capsela bursa-pastoris* (Bolsa de pastor) y *Petiveria alliacea* L. entre muchas otras. Por otro lado, muchas malezas que se desarrollan en áreas sometidas a barbecho sirven para prevenir la erosión del suelo y para reciclar los nutrientes minerales del suelo e incluso las plantas cultivables que aparecen en áreas de cultivo diferente también son consideradas como malezas (Baskin y Baskin 1977, 1978). Esto hace que prácticamente cualquier planta pueda ser considerada mala hierba si crece en un lugar en el que no es deseable. Por lo tanto, debe quedar claro que el término "maleza" es un concepto relativo y antropocéntrico, y de ningún modo constituye una categoría absoluta (Neve et al., 2009).

Es bien sabido que las malezas compiten con las plantas cultivables por los nutrientes del suelo, por agua y por luz (Karssen et al., 1988; Benech-Arnol et al., 2000; Forcella et al., 2000). Por otro lado, estas plantas indeseables también sirven de hospederas a insectos y patógenos dañinos a las plantas cultivables. Sus exudados radicales y lixiviados foliares resultan ser tóxicos a las plantas cultivables. Sin embargo, en los escenarios agrícolas los mayores daños causados por las malezas provienen de las evaluaciones de pérdidas de cosechas agrícolas (Gibson et al., 2008). De manera general, se considera que las malezas ocasionan una pérdida directa aproximada del 10% de la producción agrícola. En cereales por ejemplo, esta pérdida es del orden de más de 150 millones de toneladas a nivel mundial (Labrada y Parker, 1996). Sin embargo, tales pérdidas no son iguales en los distintos países, regiones del mundo y cultivos afectados. En la década de 1980, se estimó que las pérdidas de la producción agrícola causada por las malezas ascendían a 7% en Europa y 16% en África, mientras que en el cultivo del arroz fueron de 10,6%, 15,1% en caña de azúcar y 5,8% en algodón (Fletcher, 1983). Las malezas también obstruyen el proceso de cosecha y aumentan los costos de tales operaciones (Labrada y Parker, 1996). Además, al momento de la cosecha, las semillas de las malezas pueden contaminar la producción obtenida (i.e. *Datura ferox* en el cultivo

de soja). Finalmente, la presencia de las malezas en áreas cultivables reduce la eficiencia de la fertilización y la irrigación, facilita el aumento de la densidad de otras plagas y al final los rendimientos agrícolas y su calidad decrecen severamente.

La mayoría de las especies maleza, principalmente aquellas de climas templados, tienen semillas que presentan dormición, lo cual les permite la formación de bancos de semillas (persistentes y transitorios) y dificulta la predicción del momento y el porcentaje de emergencia de las mismas en condiciones naturales y de cultivo (Baskin y Baskin 1981; Benech-Arnold y Sánchez, 1995). Es por ello que si queremos predecir el momento y la proporción de semillas que emergerá del banco de semillas, debemos conocer y considerar los cambios en el nivel de dormición en función de los factores que la regulan (Bradford, 1995, 2002; Benech-Arnold et al., 2000; Allen, 2003).

### ***1.2 Dormición de semillas***

La dormición es, posiblemente, el proceso que más afecta la dinámica de emergencias del banco de semillas (Forcella et al., 2000; Grundy, 2003). La dormición proporciona una estrategia a las semillas para propagar la germinación en el tiempo con el fin de reducir el riesgo de muerte prematura en un entorno desfavorable. La dormición en semillas es causada por uno o más bloqueos que impiden la germinación aún en condiciones de humedad, aireación y temperatura adecuadas (Amen, 1968; Egley, 1986; Murdoch, 2004).

En un intento de formular una definición, Bewley y Black (1982) definen la dormición como una característica interna de la semilla que impide la germinación bajo condiciones ambientales, que en otras circunstancias hubieran resultado adecuadas para la germinación. Por otro lado, Vleeshouwers et al. (1995), plantearon que la dormición es *“una característica de la semilla, cuyo nivel definirá qué condiciones se deben cumplir para que la semilla germine”*. Más adelante, Benech-Arnold et al. (2000) propusieron una definición de dormición que refuerza el carácter intrínseco del fenómeno, definiéndola como *“una condición interna de las semillas que impide su germinación bajo condiciones hídricas, térmicas y gaseosas que en otras circunstancias hubieran sido adecuadas para que la germinación tenga lugar”*. Todas estas definiciones denotan que una vez que las impedancias han sido removidas, la germinación ocurrirá en un amplio rango de condiciones ambientales. Dependiendo del momento en el que ocurre la dormición, la misma puede ser clasificada en primaria y secundaria (Karssen, 1982; Hilhorst et al., 1996). Dormición primaria, hace referencia a la dormición que presentan las semillas recién dispersadas de la planta madre. La dormición secundaria, resulta de la reinducción de la dormición en semillas que previamente habían salido de la dormición (Hilhorst, 1995, 1998; Dyer, 1995; Benvenuti et al., 2001; Brandel y Jensen, 2005).

En muchos casos, la salida de la dormición primaria es seguida de subsecuentes reinducciones en dormición secundaria, determinando la existencia de patrones cíclicos en el nivel de dormición. Muchas malezas problemáticas, particularmente aquellas capaces de formar bancos de semillas persistentes, suelen presentar cambios cíclicos en su nivel de dormición (Baskin y Baskin, 1988). Por ejemplo, muchas especies anuales primavera-estivales presentan un alto nivel de dormición en otoño después de la dispersión, el cual disminuye durante los meses fríos del invierno, para luego volver a aumentar en los meses de verano. Por el contrario, las especies anuales de invierno, generalmente muestran un patrón temporal inverso en sus cambios en el nivel de dormición. Este comportamiento resalta el valor adaptativo de la dormición que juega un papel importante en la adaptación de las plantas a su entorno, permitiéndoles, por

ejemplo, la identificación de la estación del año que presenta condiciones ambientales favorables para el establecimiento de la planta (Karssen, 1982; Soppe y Bentsink, 2016).

### ***1.3 Factores del ambiente que regulan cambios en el nivel de dormición***

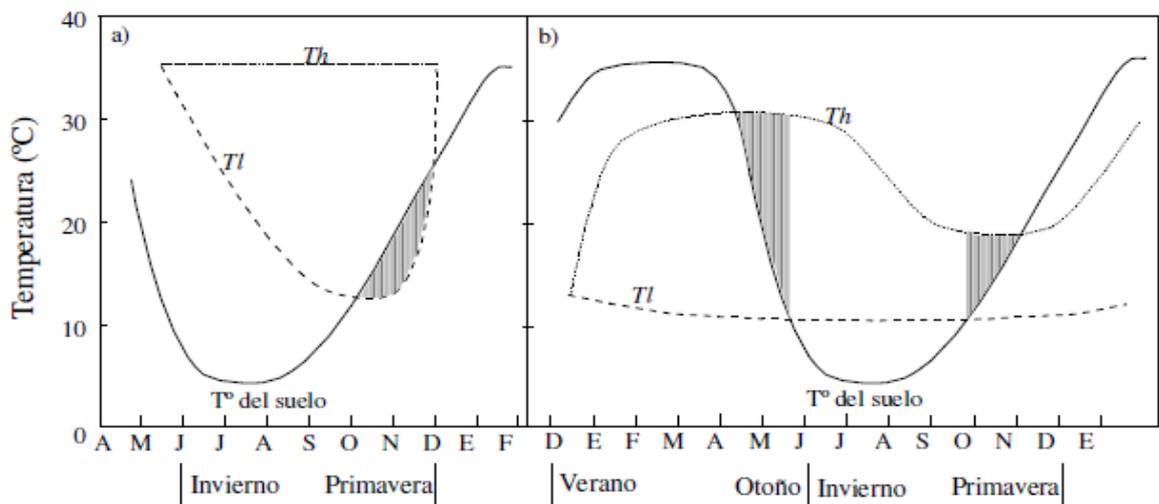
Es conocido que la temperatura y la disponibilidad hídrica son factores del ambiente que modifican el nivel de dormición de las poblaciones de semillas (Bewley, 1997; Bair et al., 2006). Estos factores alteran el nivel de dormición de los bancos de semillas determinando patrones estacionales de emergencia de las malezas en el campo (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Por ejemplo, en el caso de especies anuales de emergencia primavera-estival, las bajas temperaturas que experimentan durante el invierno actúan como aliviadoras de la dormición determinando un mínimo de dormición al inicio de la primavera, mientras que las altas temperaturas que se registran a fines de la primavera/principios de verano, inducen aumentos en el nivel de dormición determinando la entrada en dormición secundaria. Este tipo de comportamiento ha sido observado en muchas especies maleza de emergencia primavera-estival, como *Chenopodium álbum* L., *Sysimbrium officinale* L., *Polygonum persicaria* L. (Bouwmeester, 1990), *Polygonum aviculare* L. (Kruk y Benech-Arnold, 1998) y *Ambrosia artemisiifolia* L. (Baskin y Baskin, 1980). Por el contrario, en especies otoño-invernales, las temperaturas altas del verano actúan como aliviadoras de la dormición, mientras que las bajas temperaturas invernales inducen la entrada en dormición secundaria de las semillas (Karssen, 1982). Este es el caso de *Capsela bursa-pastoris* (Baskin y Baskin, 1989), *Avena fatua* (Baskin y Baskin, 1998), *Lolium rigidum* (Steadman et al., 2003a, 2003b), *Bromus tectorum* (Christensen et al., 1996) y *Lithospermum arvense* (Chantre et al., 2009).

El proceso por el cual las especies primavera-estivales disminuyen el nivel de dormición se conoce como ‘estratificación’ o ‘chilling’, que consiste en la exposición de las semillas a bajas temperaturas (invierno) bajo condiciones de humedad. En el caso de las especies otoño-invernales son las altas temperaturas actuando sobre semillas con un bajo nivel de humedad las que alivian la dormición; a este proceso se lo denomina ‘pos-maduración en seco’ o ‘after-ripening’. El nivel de humedad que presenten las semillas es determinante para que se lleven a cabo o no los procesos mencionados anteriormente. Está mayormente aceptado que es la temperatura la que modifican el nivel de dormición de las semillas mientras que el nivel de humedad de las mismas actúa como un modulador del efecto de la temperatura sobre el nivel de dormición (Benech-Arnold et al., 2014). Por ejemplo, para el caso de *Bromus tectorum* la salida de la dormición tiene lugar dentro de un rango específico de valores de humedad de la semilla (no ocurre en semillas embebidas o en semillas muy secas) y dentro de ese rango, el nivel de hidratación de la semilla modula el efecto de la temperatura sobre la tasa de salida de la dormición (Bair et al., 2006). Sin embargo, existen muy pocos estudios que han tratado de entender como la disponibilidad hídrica del suelo modula junto con la temperatura los cambios en el nivel de dormición de las poblaciones de semillas y mucho menos se ha cuantificado su respuesta.

La dormición es un fenómeno relativo más que absoluto. El concepto de niveles de dormición relativa fue introducido por Vegis (1964) a partir de las observaciones obtenidas durante la salida de la dormición, donde el rango de temperaturas permisivas para la germinación se ensancha hasta un máximo. En cambio, a medida que se induce la dormición, el rango de temperaturas sobre las que puede proceder la germinación se reduce hasta que la germinación ya no es posible a ninguna temperatura. Sobre esta base, Karssen (1982) propuso que los patrones estacionales de emergencia de las especies

anuales son el resultado combinado de los ciclos estacionales en las temperaturas del suelo y cambios fisiológicos dentro de las semillas que alteran el rango de temperatura permisivo para la germinación. Por lo tanto, la germinación en el campo se restringe a períodos en los que la temperatura del suelo y el rango de temperatura sobre el cual la germinación puede proceder se superponen.

Entonces, un aumento o disminución en el nivel de dormición podría expresarse, como una ampliación o reducción en el rango de temperaturas permisivas para la germinación. Estas variaciones en el rango de temperaturas permisivas para la germinación pueden ser cuantificadas a partir de dos temperaturas límites umbrales: temperatura del límite inferior ( $T_l$ ) y temperatura del límite superior ( $T_h$ ) (Washitani, 1987; Kruk y Benech-Arnold, 1998; Batlla y Benech-Arnold, 2003). Estas temperaturas límites ( $T_l$  y  $T_h$ ) varían entre las semillas dentro de la población (Washitani, 1987; Kruk y Benech-Arnold, 1998; Batlla y Benech-Arnold, 2003). Por ejemplo,  $T_{l(50)}$  y  $T_{h(50)}$  representan las temperaturas por debajo y por encima de las que se expresa la dormición para el 50% de la población. En especies primavera-estivales, los cambios en el nivel de dormición se deben a que aumenta o disminuye  $T_l$ , mientras que en especies de invierno por fluctuaciones en  $T_h$ . Para especies anuales de primavera-verano, como *Polygonum aviculare*, la germinación de una fracción de la población del banco de semillas se produce cuando el aumento de la temperatura del suelo (en primavera) excede la  $T_l$  para esa fracción (Vleeshouwers et al., 1995; Vleeshouwers y Bouwmeester, 2001). Esta proporción del banco de semillas de capaz emerger en un momento dado se puede predecir si la distribución de  $T_l$  dentro de la población de semilla y sus cambios asociados al nivel de dormición de las semillas son conocidos (Batlla y Benech-Arnold, 2003, 2015) (Fig. 1.1).



**Figura 1.1** Cambios estacionales en el rango de temperaturas permisivo para la germinación y su relación con la dinámica de la temperatura del suelo. Las líneas punteadas finas y las líneas gruesas indican la temperatura del límite inferior ( $T_l$ ) y temperatura del límite superior ( $T_h$ ) del rango permisivo para la germinación. La línea continua indica la temperatura del suelo ( $T^\circ$ ). El área sombreada representa el periodo en el cual ocurre la germinación en el campo. a) Para una especie anual estival y b) para una especie anual invierno-facultativa (adaptado de Probert, 1992).

Una vez que la dormición es mínima, la germinación ocurre en un amplio rango de condiciones ambientales. En efecto, el rango de temperaturas permisivas para la germinación aumenta conforme el nivel de dormición disminuye, y se estrecha en caso contrario (Vegis 1964). Análogamente, el potencial agua base ( $\Psi_b$ ; potencial agua por

debajo del cual la germinación no tiene lugar) disminuye o se incrementa frente a la reducción o al aumento en el nivel de dormición, respectivamente (Gummerson, 1986; Bradford, 1995). En muchas especies, alcanzar un mínimo nivel de dormición no implica necesariamente que las semillas vayan a germinar, ya que en algunos casos requieren de ciertos factores como por ejemplo luz y temperaturas alternadas para terminar la dormición y dar lugar al proceso de germinación (Benech-Arnold et al., 2000). En estas especies, los cambios en el nivel de dormición no sólo se traducen en variaciones en los rangos de condiciones permisivas para la germinación, sino también en modificaciones en la sensibilidad al efecto de los factores que actúan como terminadores de la dormición; esta sensibilidad aumenta en forma inversamente proporcional al nivel de dormición (Derx y Karssen, 1993; Benech-Arnold et al., 1990a).

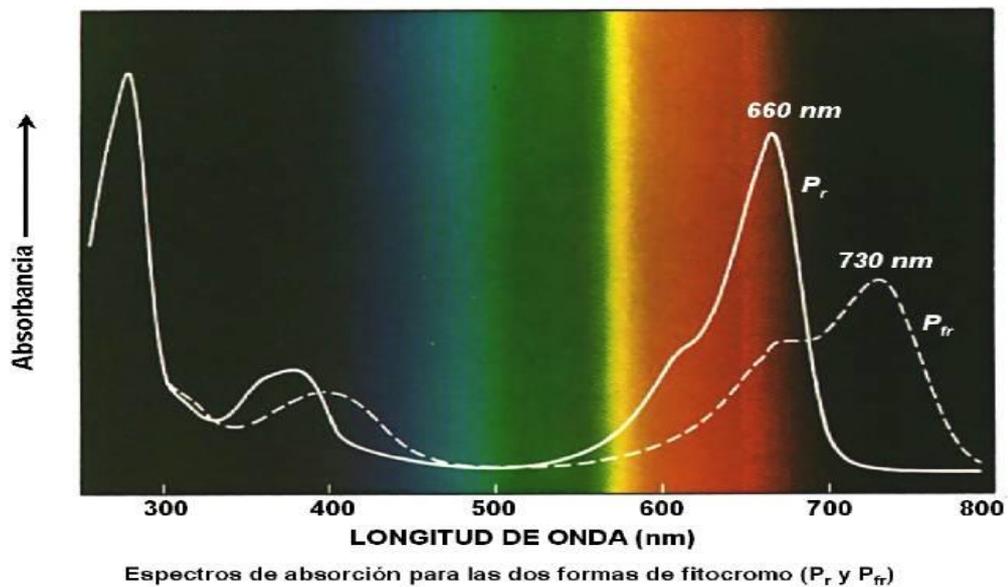
#### **1.4 Factores que actúan como terminadores de la dormición**

Una vez alcanzado el mínimo nivel de dormición, como se mencionó en el párrafo anterior, muchas especies requieren de la exposición a la luz y a las temperaturas alternadas para germinar (Scopel et al., 1991; Ghera et al., 1992; Benech-Arnold et al., 2000).

##### **1.4.1 Luz**

Existen muchas evidencias que indican que la luz es uno de los principales factores que actúan como terminador de la dormición (Vázquez-Yanez y Smith, 1982; Cone et al., 1985; Scopel et al., 1991; Bewley y Black, 1992; Benech-Arnold et al., 2000). El requerimiento de este factor se relaciona con la posibilidad que tienen algunas semillas de detectar brechas en el canopeo y/o la profundidad a la que se encuentran enterradas (Thompson y Grime, 1983; Benech-Arnold et al., 1988; Ghera et al., 1992). Esta capacidad de detectar diferentes condiciones del entorno a través de la luz les permite a las semillas poder ajustar en forma estacional y espacial su germinación dentro del tiempo de emergencia (Pons, 1991; Casal, 2013).

Las semillas perciben el estímulo lumínico a través de fotorreceptores, principalmente aquellos pertenecientes a la familia de los fitocromos. En *Arabidopsis thaliana* se conocen 5 fitocromos (*PHYA – PHYE*) (Bortwick et al., 1954; Smith, 1982; Clack et al., 1994), 5 en *Lycopersicon esculentum* (*PHYA, PHYB1, PHYB2, PHYD* y *PHYF*) (Pratt et al., 1997) y 3 en *Oryza sativa* (*PHYA - PHYC*) (Bae y Choi, 2008). Los fitocromos poseen dos formas inter-convertibles: *Pfr* (considerada la forma activa para la germinación) que presenta su máxima absorción alrededor de los 730 nm (luz rojo lejano) y *Pr*, el cual presenta su máxima absorción alrededor de los 660 nm (luz roja) (Fig. 1.2). Los fitocromos son sintetizados en la semilla en la forma *Pr* y la proporción que pasa a la forma activa (*Pfr*) depende del ambiente lumínico (composición espectral de la luz e irradiancia) al que una semilla se encuentra expuesta. Por ejemplo, exposiciones a un ambiente lumínico caracterizado por una alta relación rojo-rojo lejano (*R:RL*) resulta en una alta proporción de la molécula en su forma activa (*Pfr*), determinando en semillas que requieren este estímulo la terminación de la dormición y consecuentemente dando lugar, en condiciones favorables, al proceso de germinación.



**Figura 1.2** Espectro de absorción de las dos formas del fitocromo ( $P_r$  y  $P_{fr}$ ). Estas diferencias en la absorción hicieron posible el aislamiento del fitocromo. (Figura modificada de Salisbury, F.B. y Ross, C.W., 1991. “*Plant Physiology*”, 2nd ed., Wadsworth Publishing Company).

La terminación de la dormición ocurre cuando la cantidad de  $P_{fr}/P_{total}$  establecida se encuentra por encima de un valor umbral característico de cada especie (Bewley y Black, 1982; Casal y Sánchez, 1998). Una característica importante de los espectros de absorción para ambas formas del fitocromo es la superposición de los mismos. Esto determina que la cantidad de  $P_{fr}$  establecida luego de una exposición saturante de rojo alcance valores cercanos al 86% de  $P_{fr}$ , mientras que luego de una exposición de rojo lejano la cantidad de  $P_{fr}$  obtenida sea de 3%. Existen tres modos de acción del fitocromo. El primero de estos, ésta mediado por el fitocromo A (*PHY-A*) y se denomina respuesta del tipo VLFR (*Very Low Fluence Response*) (Botto et al., 1996; Shinomura et al., 1996). Este modo de acción se expresa con exposiciones a muy bajos flujos de fotones que establecen porcentajes de  $P_{fr}/P_{total}$  entre  $10^{-4}$  y  $10^{-2}$ . Este tipo de respuesta, no reversible, estimula la terminación de la dormición en algunas especies de malezas ante brevísimas exposiciones a la luz (Scopel et al., 1991; Derks y Karssen, 1993). El segundo tipo de respuestas es LFR (*Low Fluence Response*). Esta respuesta esta mediada por el fitocromo B, requiere de exposiciones a bajos flujos de fotones, que establecen porcentajes de  $P_{fr}/P_{total}$  entre 1 y 86% (Cone et al., 1985; Shinomura et al., 1994; Botto et al., 1995; Casal y Sánchez, 1998). Este modo de acción está caracterizado por presentar reversibilidad y cumplir con la ley de reciprocidad (Borthwick et al. 1952; Neff et al., 2000). Un último tipo de respuesta, también mediada por el fitocromo A, son las respuestas del tipo HIR (*High Irradiance Response*). Hartmann, 1966 propuso que las respuestas del tipo HIR se manifiestan con exposiciones prolongadas a luz con altos flujos de fotones (PFD) siendo los más efectivos aquellos con longitudes de onda de 710-720nm o 340-500nm. Este tipo de respuesta se caracteriza por no mostrar reciprocidad e inhibir la germinación (Wall y Johnson, 1983; Frankland y Taylorson, 1983; Contreras et al., 2009; Piskurewicz et al., 2009; Górski et al., 2013).

Los modos de acción del fitocromo que se describieron anteriormente (LFR, VLFR y HIR) están involucrados en diferentes respuestas de las semillas a la luz en condiciones naturales (Casal y Sánchez 1998; Pons, 2000; Casal et al., 2014). La promoción de la germinación de las semillas puede estar mediada por una respuesta del

tipo LFR y/o VLFR, mientras que la inhibición de la germinación de las semillas puede estar mediada por una respuesta del tipo LFR y/o HIR. Sin embargo, En los sistemas agrícolas, muchas veces se ve afectada la respuesta que pueden presentar las semillas a la luz, debido a la profundidad que están enterradas (Benvenuti et al., 2001; Grundy et al., 2003; Maraghni et al., 2010), la densidad del canopeo (Fenner, 1980; Pons; 1983; Batlla et al., 2000; Górsky et al., 2013), la cobertura del suelo (Kruidhof et al., 2008; Chauhan y Johnson, 2009), la disponibilidad hídrica en el suelo (Batlla y Benech-Arnold, 2006, 2007; Tang et al., 2016) y las diferentes prácticas agrícolas (Scopel et al., 1991, Botto et al., 1998, 2000; Benech-Arnold et al., 2000).

#### **1.4.2 Temperaturas alternadas**

Muchas especies maleza requieren del estímulo de la alternancia de temperaturas para terminar la dormición y dar lugar al proceso germinativo (Roberts y Totterdell, 1981; Benech-Arnold et al., 1990a, b; Batlla et al., 2003; Huarte y Benech-Arnold, 2005). Para las semillas enterradas en el banco de semillas, las temperaturas alternadas constituyen una señal ambiental importante para la terminación de la dormición, ya que por debajo de los primeros milímetros de profundidad, la influencia del ambiente lumínico es nula y este mecanismo les permite determinar la profundidad a la que se encuentran enterradas (Bliss y Smith, 1985; Tester y Morris, 1987; Pons, 2000). Se han identificado varios atributos de los ciclos de temperatura fluctuante que podrían ser responsables de su efecto estimulante. Entre los más relevantes se ha observado un aumento en la respuesta ante aumentos en la amplitud térmica del ciclo. Por ejemplo, en *Chenopodium album* se observó un incremento en la proporción de semillas que salían de la dormición cuando la amplitud del ciclo era entre 2,4 y 15 °C (Murdoch y Roberts, 1997). Por otro lado, Benech-Arnold et al. (1990a) observaron que el efecto estimulante de los ciclos es acumulativo, lo que significa que ante el aumento en el número de ciclos se incrementa la proporción de la población que sale de la dormición. Por ejemplo, en el caso de *Sorghum halepense*, 10 ciclos de temperaturas alternadas determinaron la terminación de la dormición en el doble de individuos que cuando la población fue expuesta a 5 ciclos de temperaturas alternadas (Benech-Arnold et al., 1990a).

#### **1.5 Desarrollo de modelos predictivos**

El uso de modelos predictivos para definir estrategias de control de malezas es cada vez más relevante debido a las presiones actuales de reducir el uso excesivo de insumos químicos en las producciones agrícolas (Grundy et al., 2000). Los modelos de emergencia utilizan el tiempo biológico, en el cual la germinación avanza a diferentes tasas de acuerdo a las condiciones ambientales (Bradford 1996; Finch-Savage, 2004). Estas tasas se determinan mediante el incremento del progreso hacia la germinación como una función de la diferencia entre las condiciones ambientales y un valor umbral mínimo, por debajo del cual no se completa la germinación, o un valor umbral máximo, por encima del cual tampoco hay respuesta (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Por ejemplo, la respuesta de una semilla en términos de cuándo y si se lleva o no a cabo la germinación, está determinada por su umbral de sensibilidad en relación con las señales que hay en el ambiente; cuanto mayor sea la señal por encima del umbral, más rápida será la respuesta. Sin embargo, las poblaciones de semillas de especies silvestres tienden a presentar dormición en sus semillas, y a la vez, la profundidad de la dormición tiende a variar ampliamente, y por ende, también los umbrales requeridos para que ocurran cambios en el nivel de dormición y para permitir la germinación varían (Bewley et al., 2013).

En los últimos años se han desarrollado diversos tipos de modelos buscando

predecir los cambios en el nivel de dormición que experimentan los bancos de semillas. Entre ellos, se han desarrollado modelos de salida de la dormición para varias especies, como *Bromus tectorum* (Bauer et al., 1998), *Aesculus hippocastanum* (Pritchard et al., 1996), *Polygonum aviculare* (Batlla y Benech-Arnold, 2003, 2005, 2006), *Lithospermum arvense* (Chantre et al., 2009), etc. Sin embargo, son pocos los intentos de incluir en los modelos los cambios en el nivel de dormición durante la entrada en dormición secundaria con el objetivo de predecir los cambios cíclicos en el nivel de dormición (Batlla y Benech-Arnold, 2010). Entre algunos modelos podemos mencionar a Vlesshouwers y Kropft (2000) y Vlesshouwers y Bowmeester (2001) que desarrollaron modelos predictivos del ciclado de la dormición para tres especies maleza. En estos modelos la tasa de entrada en dormición secundaria aumentaba en forma lineal con la temperatura por encima de los 8 °C para dos de las especies estudiadas, mientras que para la tercera especie presentaba un óptimo en 10 °C. Los resultados obtenidos mostraron que los modelos desarrollados podían predecir con cierta exactitud los cambios relativos en el nivel de dormición, pero no eran lo suficientemente precisos como para predecir los patrones de emergencia en el campo. En base a estos resultados, los autores concluyeron que era preciso mejorar la simulación de los cambios en el nivel de dormición de las semillas enterradas para poder predecir la emergencia en situaciones de campo.

Otro factor ambiental importante que puede afectar los niveles de dormición de la población de semillas en el campo es el contenido hídrico del suelo a través de su efecto sobre el nivel de humedad de las semillas (Baskin y Baskin, 1998). En relación a las evidencias disponibles en donde se cuantificó el efecto de este factor sobre la salida de la dormición, se observó la existencia de un mínimo nivel de humedad para que la salida de la dormición tenga lugar, y luego un aumento de la tasa de salida hasta un valor donde la tasa se hace máxima. Por ejemplo, Wang et al. (2009) observaron que la salida de la dormición a bajas temperaturas en *Vitis vinicola* era nula por debajo del 20% de humedad de la semilla, para luego aumentar hasta hacerse máxima en 40% de humedad. A su vez, Bair et al. (2006) cuantificaron el efecto del estado hídrico del suelo en la salida de la dormición en semillas de *Bromus tectorum*, observando que la inclusión de este factor en el modelo desarrollado permitía mejorar la predicción realizada. Más allá de estas evidencias, existen muy pocos estudios que hayan intentado caracterizar, y menos aún, cuantificar el efecto del contenido hídrico del suelo sobre los cambios en el nivel de dormición de las poblaciones de semillas durante la salida de la dormición e inducción en dormición secundaria.

### **1.6 Planteo del problema**

Han existido diversos esfuerzos por desarrollar modelos que permitan predecir los cambios en el nivel de dormición que experimentan los bancos de semillas. Sin embargo, son muy pocos los modelos de predicción de emergencia de malezas que han intentado incluir la inducción en dormición secundaria en las simulaciones y mucho menos el efecto de la disponibilidad hídrica sobre la entrada en dormición secundaria. Existe suficiente información que involucra a la temperatura como factor principal de los cambios en el nivel de dormición (Bewley, 1997). Por ejemplo, Batlla et al. (2009) reportaron que semillas de *Polygonum aviculare*, al ser almacenadas a altas temperaturas (20 – 25 °C) mostraban una disminución del porcentaje de germinación, lo cual demuestra el efecto de las altas temperaturas sobre la inducción en dormición secundaria. Por otro lado, Kebreab y Murdoch (1999) desarrollaron un modelo para determinar la tasa de salida y entrada en dormición secundaria en semillas embebidas de *Orobancha spp.* Los resultados encontrados mostraron que a 10°C las semillas salen de la dormición primaria y, por el

contrario, a temperaturas mayores de 15°C la inducción en dormición secundaria ocurre a una tasa mayor a medida que aumenta la temperatura. Por lo tanto, la temperatura estaría determinando la tasa con la cual entran en dormición secundaria. Sin embargo, no se ha intentado cuantificar el efecto de la temperatura sobre la inducción en dormición secundaria.

En relación con las evidencias expuestas anteriormente provenientes de experimentos en los que se cuantificó el efecto de la disponibilidad hídrica sobre la salida de la dormición en otras especies, se observó que la disponibilidad hídrica del suelo estaría jugando un rol importante en los cambios asociados al nivel de dormición determinados por la temperatura. Sin embargo, la influencia del contenido de humedad de las semillas sobre los cambios en la dormición, ha sido raramente cuantificada y, mucho menos, incluida en modelos predictivos. Es por ello que, a pesar de los avances que se han realizado en la comprensión del fenómeno de enmalezamiento en las últimas décadas, la persistencia de las problemáticas asociadas a la dormición en los sistemas agrícolas actuales pone en evidencia nuestra incapacidad para predecir y eventualmente controlar este fenómeno con precisión suficiente. Esto se debe, en parte, a nuestro desconocimiento de distintos aspectos relacionados a la regulación del proceso.

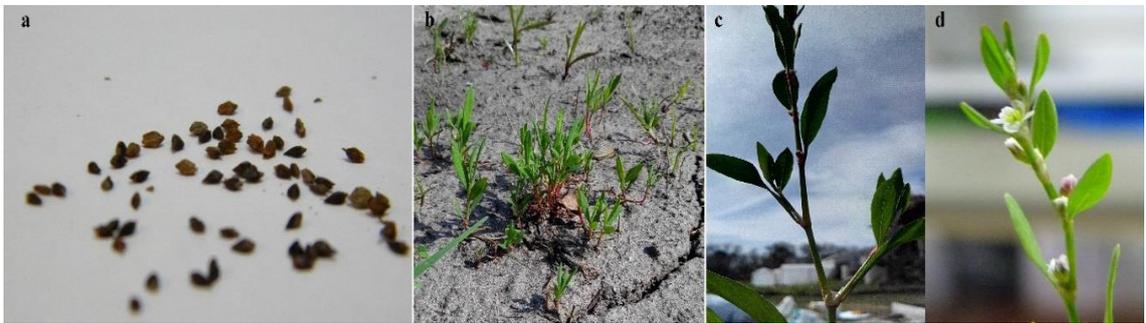
En efecto, el hecho de que no se hayan desarrollado modelos que contemplen los efectos de la temperatura y el contenido hídrico en el suelo sobre la entrada en dormición secundaria se debe fundamentalmente a que este fenómeno ha sido escasamente estudiado. Esto ha determinado que la mayoría de los modelos disponibles no sean capaces de predecir los cambios cíclicos en el nivel de dormición, y consecuentemente, no permitan predecir con exactitud el período de emergencia de las malezas en condiciones de campo. El presente proyecto de investigación propone caracterizar y cuantificar el efecto de la temperatura sobre la entrada en dormición secundaria, y del contenido hídrico del suelo sobre la salida de la dormición primaria y la entrada en dormición secundaria en semillas de *Polygonum aviculare*, una maleza primavero-estival, e incluir las relaciones cuantitativas establecidas en un modelo que sea capaz de predecir los cambios cíclicos en el nivel de dormición en poblaciones de semillas enterradas.

### **1.7 Caso de estudio: *Polygonum aviculare* L. (Sanguinaria o cien nudos)**

*Polygonum aviculare* L. (sanguinaria o cien nudos) es una planta anual herbácea o subherbácea de origen eurasiático, se encuentra frecuentemente como ruderal y arvense principalmente en condiciones de climas templados (Fig. 1.3). Su nombre *aviculare* se debe a que muchas especies de pájaros acuden a comer sus pequeñas semillas. *P. aviculare* se comporta como maleza de gran importancia en cultivos de cereales, especialmente en cultivos de trigo, cebada y en algunos casos maíz (Marzocca, 1976; Alonso, 1984; Holm et al., 1997). Se propaga por semilla, y en condiciones naturales sus semillas son dispersadas a mediados del otoño, presentando las mismas un alto nivel de dormición al momento de su dispersión (Ransom, 1935; Hammerton, 1964; Courtney, 1968; Khan y Ungar, 1997; Kruk y Benech-Arnold, 1998).

Existe evidencia que las bajas temperaturas del invierno disminuyen los niveles de dormición en semillas de esta especie, mientras que las altas temperaturas inducirían la entrada en dormición secundaria (Ransom, 1935; Hammerton, 1964; Courtney, 1968; Baskin y Baskin, 1988, 1990; Kruk y Benech-Arnold, 1998). Esto determina que semillas que se encuentran enterradas en el suelo presenten patrones cíclicos en su nivel de dormición a lo largo del año (Courtney, 1968; Baskin y Baskin, 1990). Estos patrones cíclicos determinan ventanas de emergencia de la población de semillas a fines del

invierno-principios de primavera, debido al efecto de las bajas temperaturas invernales, determinando la germinación de gran parte de la población durante el transcurso de la primavera. Así mismo, las altas temperaturas que se registran durante el verano producen la entrada en dormición de la población de semillas, recomenzando el ciclo (Courtney, 1968, Kruk y Benech-Arnold, 1998, Batlla y Benech-Arnold, 2003). Estudios realizados recientemente sugieren que el efecto de la temperatura sobre el nivel de dormición en semillas de esta especie podría, a su vez, estar modulado por la disponibilidad hídrica del suelo (Wang et al., 2009). Por otro lado, ha sido documentado que la germinación de estas semillas es estimulada por luz (Courtney, 1968; Baskin y Baskin, 1988, Batlla y Benech-Arnold, 2003) y las fluctuaciones de temperatura (Thompson y Whatley, 1983), y se han detectado biotipos resistentes a varios herbicidas (Oorschot et al., 1988; Bulcke et al., 1988).



**Figura 1.3** Especie modelo primavera-estival *Polygonum aviculare* L. (Sanguinaria o cien nudos). **a)** Las semillas son aquenios ovoides, trígono de 2 a 3 mm de largo, color moreno-rojizo hasta casi negros. **b)** Plántulas emergidas de *P. aviculare*. **c)** Planta adulta herbácea, con tallos delgados, estriados, simples hasta muy ramificados que forman matas postradas de aproximadamente 1 m de diámetro y hasta 50 cm de altura. **d)** Flores axilares, solitarias o agrupadas en glomérulos, perianto verdoso con márgenes blanquecinos o rosados.

En este contexto, esta especie resulta un sistema experimental atractivo para el estudio y posterior modelado de los patrones de dormición que presentan las semillas de malezas enterradas en el suelo, debido a: i) su gran importancia económica como maleza, ii) los estudios previos que han permitido comprender y modelar los cambios en los niveles de dormición en esta especie y que, por lo tanto, sirven de base en los aspectos para los que se propone avanzar esta tesis, y iii) la evidencia experimental disponible, que la presenta como un sistema adecuado para el estudio de la dormición, debido a que presenta un patrón cíclico de variación en el nivel de dormición en el suelo, y respuesta a la luz y a las temperaturas alternadas.

## 1.8 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 1.8.1 *Objetivo general del proyecto*

Este proyecto de tesis tiene como objetivo general estudiar los procesos de salida de dormición primaria, inducción y expresión de la dormición secundaria en semillas de *Polygonum aviculare* en función del ambiente térmico e hídrico.

### 1.8.2 *Objetivos específicos e hipótesis*

1) Caracterizar el rol del contenido hídrico del suelo durante la salida de la dormición primaria y la inducción en dormición secundaria de semillas de *P. aviculare*.

**Hipótesis 1a** – Durante el proceso de salida de la dormición primaria el contenido hídrico del suelo afecta la tasa con la cual las semillas de *P. aviculare* salen de la dormición.

**Hipótesis 1b** – Durante el proceso de inducción en dormición secundaria el contenido hídrico afecta la tasa con la cual las semillas de *P. aviculare* son inducidas en dormición secundaria.

2) Caracterizar el rol de la temperatura durante la inducción en dormición secundaria en semillas de *P. aviculare* y establecer relaciones cuantitativas entre los cambios en el nivel de dormición, medidos a partir de modificaciones en el rango térmico permisivo para la germinación.

**Hipótesis 2** – La entrada en dormición secundaria ocurre a partir de una temperatura umbral, por encima de la cual la inducción tiene lugar a mayor o menor velocidad dependiendo de los días de exposición y la temperatura predominante.

3) Cuantificar los cambios en el nivel de dormición durante la inducción en dormición secundaria, medidos a partir de cambios en la sensibilidad a los factores que terminan la dormición (i.e. luz y temperaturas alternadas).

**Hipótesis 3** – Durante la inducción en dormición secundaria disminuye la sensibilidad a la luz y a las temperaturas alternadas.

4) En función de las relaciones cuantitativas establecidas anteriormente, desarrollar un modelo que permita simular cambios cíclicos en el nivel de dormición en poblaciones de semillas enterradas de *P. aviculare*, y poner a prueba su funcionamiento con datos de emergencia obtenidos a campo.

### ***1.9 Estructura de la Tesis***

La presente tesis se estructura en 5 Capítulos. Con el propósito de cumplir con los objetivos propuestos, los resultados de este trabajo se presentan en los capítulos 2, 3, y 4. En cada uno de ellos, se presenta una introducción al tema, los objetivos particulares y se discuten los resultados obtenidos. En el Capítulo 2, se describen los resultados de un análisis cuantitativo que caracteriza la entrada en dormición secundaria y la construcción de un modelo de tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) desarrollado a partir cambios en los parámetros térmicos de la población de semillas. En el Capítulo 3 se describen los resultados de un análisis de la salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria en función de la disponibilidad hídrica de las semillas y se propone la construcción de un modelo predictivo. En el Capítulo 4 se describen los resultados de un análisis cuantitativo de la respuesta a ciclos de temperaturas fluctuantes en relación con el nivel de dormición de la población de semillas durante la entrada en dormición secundaria y se propone un modelo predictivo. A su vez, se presentan los resultados de un análisis de los cambios en la sensibilidad a la luz de las semillas en relación con el nivel de dormición de la población y también se propone un modelo para predecir respuestas del tipo LFR, VLFR y oscuridad en función de la temperatura de entrada en dormición secundaria. Finalmente, el Capítulo 5 comprende la discusión general de los resultados obtenidos en esta tesis.



## **CAPÍTULO 2**

### **REGULACIÓN DE LA INDUCCIÓN EN DORMICIÓN SECUNDARIA EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA, EN SEMILLAS DE *Polygonum aviculare* L.: UN ANÁLISIS CUANTITATIVO**



## CAPÍTULO 2\*

### 2. REGULACIÓN DE LA INDUCCIÓN EN DORMICIÓN SECUNDARIA EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA, EN SEMILLAS DE *Polygonum aviculare* L.: UN ANÁLISIS CUANTITATIVO

#### 2.1 Introducción

*Polygonum aviculare* L. (Sanguinaria o cien nudos) pertenece a la familia de las Polygonaceae y es una maleza cosmopolita herbácea anual común de verano de climas templados (Holm et al., 1997). En condiciones naturales las semillas de *P. aviculare* tienden a formar bancos de semillas persistentes en el suelo y muestran cambios cíclicos en el nivel de dormición dependiendo de la estación predominante (Courtney, 1968; Baskin y Baskin, 1985; 1990; Forcella et al., 2000). Como ya se mencionó en el Capítulo 1, dependiendo del momento en el que ocurre, la dormición puede clasificarse en dormición primaria y secundaria (Karssen, 1982). La dormición primaria se refiere a la condición innata que presentan las semillas cuando son dispersadas por la planta madre (Bewley y Black, 1994). La dormición secundaria se refiere a un estado de dormición que se induce en las semillas no dormidas, o re-inducida en semillas una vez que han alcanzado un nivel bajo de dormición. Las semillas de *P. aviculare* usualmente presentan un alto nivel de dormición (dormición primaria) al momento de la dispersión, la cual normalmente ocurre a finales de verano (Kruk y Benech-Arnold, 1998; Batlla y Benech-Arnold, 2003). Este alto nivel de dormición se evidencia por el hecho de que las semillas recién dispersadas no germinan a ninguna temperatura (Batlla y Benech-Arnold, 2003). Las semillas salen de la dormición si están embebidas y expuestas a bajas temperaturas (estratificación); estas condiciones prevalecen normalmente en el suelo durante los meses después de la dispersión (es decir, otoño e invierno), determinando de este modo un bajo nivel de dormición al final del invierno (Baskin y Baskin, 1998; Batlla y Benech-Arnold, 2003). Durante la primavera, las semillas que por diferentes razones no germinaron, son expuestas al incremento de las temperaturas, y por lo tanto, son inducidas en dormición secundaria evitando de este modo la germinación durante los meses de verano. Como se ha mencionado en el capítulo introductorio, estos cambios estacionales en el nivel de dormición en semillas son regulados principalmente por la temperatura, aunque este efecto sea posiblemente modulado también por otros factores como, por ejemplo, el nivel de hidratación de las semillas.

El nivel de dormición de una población de semillas puede variar en una escala de grados de dormición continua, entre un punto donde la dormición es máxima y otro punto en la que es mínima (Batlla et al., 2004). El grado o nivel de dormición de una población de semillas establece la amplitud del rango de condiciones ambientales que permiten la germinación (Vegis, 1964). Por ejemplo, a medida que disminuye el nivel de dormición, el rango de temperaturas permisivas para la germinación se ensancha gradualmente hasta un máximo, mientras que, cuando se induce en dormición secundaria (aumenta el nivel de dormición), el rango de temperaturas permisivas para la germinación se estrecha hasta que la germinación ya no es posible a ninguna temperatura y las semillas alcanzan “dormición absoluta” (Karssen, 1982; Bouwmeester y Karssen, 1992). Por lo tanto, a excepción de la población de semillas (o una fracción de una población de semillas) que

---

\* Los datos presentados en este Capítulo han sido publicados en: Malavert, C., Batlla, D. and Benech-Arnold R.L. (2017). Temperature-dependent regulation of induction into secondary dormancy of *Polygonum aviculare* L. seeds: A quantitative analysis. *Ecological Modelling* 352:128-138.

muestra “dormición absoluta” y, por consiguiente, no germina a ninguna temperatura, la dormición en semillas es un fenómeno relativo que, dependiendo del nivel de dormición de la población, puede ser expresado a determinadas temperaturas de incubación, pero no a otras (Hilhorst, 2007). En especies primavero-estivales como *P. aviculare*, cambios en el rango de temperaturas permisivas para la germinación durante la salida e inducción en dormición son principalmente una consecuencia de un incremento o disminución, respectivamente, en la capacidad de las semillas de germinar a bajas temperaturas, mientras que la germinación a altas temperaturas suele ser posible incluso cuando las semillas todavía tienen un alto nivel de dormición (Courtney, 1968).

Los conceptos de “temperatura del límite inferior ( $T_l$ )” y “temperatura del límite superior ( $T_h$ )” introducidos por Washitani (1987) permiten dar cuenta de esta expresión de la dormición dependiente de la temperatura y han sido ampliamente utilizados en trabajos anteriores con esta especie (Batlla y Benech-Arnold, 2003, 2015). Cuando una población de semillas muestra expresión de la dormición dependiente de la temperatura, los porcentajes de germinación final disminuyen gradualmente a medida que la temperatura de incubación se aparta de aquella a la cual la dormición no se expresa (o se expresa menos), una temperatura considerada a veces erróneamente como “temperatura óptima”. Esta disminución gradual puede ser considerada como una consecuencia del diferente nivel de dormición en los individuos que componen la población (Batlla y Benech-Arnold, 2015). Ese diferente nivel de dormición entre los individuos se manifiesta como una temperatura diferente a la cual la dormición empieza a expresarse o, en palabras de la ecuación de Washitani, como una “temperatura del límite inferior ( $T_l$ )” o “temperatura del límite superior ( $T_h$ )” diferente. Por esta razón, se considera que tanto la  $T_l$  como la  $T_h$  se distribuyen normalmente dentro de la población, con una media de  $T_{l(50)}$  y  $T_{h(50)}$  con sus respectivos desvíos estándar  $\sigma_{Tl}$  y  $\sigma_{Th}$  (Washitani, 1987; Kruk y Benech-Arnold, 1998, 2000; Batlla y Benech-Arnold, 2003). En semillas de *P. aviculare*, durante la salida de la dormición primaria (e.j. estratificación a bajas temperaturas 0 – 10 °C), el rango de temperaturas para la germinación se amplía como consecuencia de una disminución en la  $T_l$ . Se ha demostrado que esta disminución está linealmente relacionada con la acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{it}$ , del inglés, Stratification thermal time), un índice construido sobre la acumulación de temperaturas por debajo de un umbral de temperatura por encima de la cual la salida de la dormición no ocurre (Batlla y Benech-Arnold, 2003). Aunque la temperatura de estratificación no modifica la relación entre la salida de la dormición primaria (evaluada mediante cambios en  $T_l$ ) y  $S_{it}$ , sí afecta la distribución de  $T_l$  ( $\sigma_{Tl}$ ) dentro de la población de semillas, lo que a su vez afecta el comportamiento de la germinación a temperaturas de incubación cercanas a la  $T_{l(50)}$  de la población de semillas (Batlla y Benech-Arnold, 2003). Por el contrario, durante la inducción en dormición secundaria (la cual resulta de la exposición a temperaturas por encima de 10 °C) se podría esperar un estrechamiento en el rango debido a un aumento en la  $T_{l(50)}$  como lo muestran preliminarmente Batlla y Benech-Arnold (2003). Sin embargo, no se han realizado investigaciones para describir formalmente esta relación entre  $T_{l(50)}$  (y  $\sigma_{Tl}$ ) y la inducción en dormición secundaria como resultado de la exposición a temperaturas por encima de 10 °C. Tampoco se ha investigado si la temperatura de estratificación durante la salida de la dormición primaria afecta a la tasa de inducción en dormición secundaria o no.

Los objetivos de este Capítulo son: (i) establecer una relación cuantitativa entre la temperatura, la duración de la exposición y la inducción en dormición secundaria caracterizada a partir de cambios en  $T_{l(50)}$  en semillas de *Polygonum aviculare*, y ii) investigar cómo las diferentes condiciones de estratificación durante la salida de la

dormición primaria afectan la posterior tasa de inducción en dormición secundaria. Dado que el control ambiental de la inducción en dormición secundaria y, en particular, sus aspectos cuantitativos, han sido muy poco estudiados en comparación con la salida de la dormición primaria, esta investigación tiene la intención, además, de evidenciar y discutir las complejidades de estas respuestas.

## 2.2 Materiales y Métodos

Las semillas de *P. aviculare* (sanguinaria o cien nudos) se recolectaron en un campo de trigo ubicado en Balcarce (Lat. 37° 45 'S, Long. 58° 18' W), Provincia de Buenos Aires, Argentina, en el momento de su dispersión natural (marzo 2013). Después de la recolección, las semillas fueron aventadas con un soplador de semillas (Modelo 1836-3 Burrows, Evanston, IL, EE.UU.) y almacenadas (contenido de humedad en la cosecha del 12%) en frascos de vidrio negro a temperatura ambiente (aprox. 20 °C) durante 30 días hasta el comienzo del experimento. Al inicio del experimento, cuatro réplicas de 40 semillas se expusieron a una prueba inicial de germinación (ver el test de germinación) para cuantificar el nivel de dormición inicial de la población (germinación observada <2%).

### 2.2.1 Condiciones térmicas durante el almacenamiento

#### 2.2.1.1 Salida de la dormición primaria

En mayo de 2013, se colocaron grupos de aproximadamente 300 semillas en bolsas de malla de nylon y se enterraron a 4 cm de profundidad en macetas de plástico negro con diámetro de 8 cm, conteniendo un sustrato de tierra (40%), arena (40%) y vermiculita (20%). Las macetas se regaron a saturación, se dejaron drenar durante 48 h, y se pesaron para determinar el peso que corresponde a capacidad de campo para cada maceta. La constancia del contenido de humedad del sustrato se revisó periódicamente durante el experimento. En el caso de observarse valores de peso menores a los determinados para capacidad de campo, se añadió agua hasta que llegaran a su peso original para mantener su estado inicial de contenido hídrico. Las bandejas con las macetas fueron expuestas a tres temperaturas de estratificación: 1.6, 5 y 10 °C, ubicándolas en cámaras incubadoras calibradas a esas temperaturas. A intervalos de tiempo durante todo el período de estratificación, cuatro bolsas de malla de nylon que contienen las semillas (cuatro repeticiones) fueron exhumadas de las bandejas ubicadas a cada temperatura de estratificación y puestas a germinar como se describe más abajo en el test de germinación. Las semillas estratificadas a cada temperatura se exhumaron al acumular la misma cantidad de unidades de tiempo térmico de estratificación (°Cd) de acuerdo con el modelo propuesto por Batlla y Benech-Arnold, (2003):

$$S_{tt} = \text{Días} \cdot (T_c - T_s) \quad \text{Ecuación (2.1)}$$

donde  $S_{tt}$ , es el tiempo térmico de estratificación (°Cd),  $T_c$  es la temperatura de salida de la dormición (umbral) (es decir, 17 °C, para *P. aviculare*, temperatura a la cual, o sobre la cual, la salida de la dormición no ocurre) y  $T_s$  es la temperatura media diaria de estratificación (Batlla y Benech-Arnold, 2003).

#### 2.2.1.2 Inducción en dormición secundaria

Para inducir las semillas en dormición secundaria se usaron dos enfoques diferentes: (i) las bandejas con macetas que contenían semillas previamente estratificadas a 5 °C y que habían alcanzado un nivel de dormición “bajo” (acumularon 1500 °Cd de

acuerdo con la ecuación 2.1) se almacenaron a diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25 y 30 °C), de acuerdo con resultados obtenidos en experimentos preliminares (Malavert et al., 2014) llevados a cabo para inducir en dormición secundaria las semillas de *P. aviculare*. A intervalos de tiempo durante todo el período de inducción en dormición secundaria, cuatro bolsas de malla de nylon que contenían semillas (cuatro repeticiones) fueron exhumadas de las bandejas almacenadas a cada una de las temperaturas y evaluadas en el test de germinación como se describe más abajo, hasta que no se observó más germinación (“máximo nivel de dormición”). (ii) Las bandejas con macetas que contenían las semillas previamente estratificadas a diferentes temperaturas (1.6, 5 y 10 °C), pero que habían acumulado la misma cantidad del tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) según la ecuación (2.1), y por lo tanto deberían haber alcanzado un mismo nivel de dormición, fueron expuestas a una temperatura única (20 °C) para inducir las semillas en dormición secundaria. A intervalos de 0, 2, 4, 8, 14 y 20 días durante todo el período de inducción en dormición, cuatro bolsas de malla de nylon que contenían semillas (cuatro repeticiones) fueron exhumadas y se les realizó el test de germinación como se describe más abajo. Durante el tiempo de almacenaje para la salida y la inducción en dormición secundaria, la temperatura del suelo en las macetas se registró en forma horaria utilizando sensores de temperatura (RC-30B *Temperature Data-Logger*, Schwyz).

### **2.2.2 Test de germinación**

Las semillas fueron exhumadas bajo luz verde fluorescente tenue, y las bolsitas se lavaron con agua destilada para eliminar las partículas de suelo adheridas a las mismas. Cuatro réplicas de 40 semillas se colocaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían 5 ml de agua destilada sobre dos discos de papel de filtro (Whatman No. 3). A continuación, las semillas fueron expuestas a un pulso saturante de luz roja (proporción calculada del fitocromo como  $Pfr/Pt = 87\%$ ,  $35 \text{ mmol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) proporcionada por tubos fluorescentes rojos (Philips 40/15, Alemania) durante 20 minutos (Casal et al., 1991; Batlla y Benech-Arnold, 2005). Después de esto, las réplicas se colocaron en cámaras de germinación a temperaturas constantes de 10, 15, 20, 25 y 30 °C para determinar el nivel de dormición de la población de semillas. Las semillas germinadas se contaron cada 2 días durante un intervalo de 15 días. Las semillas fueron expuestas a luz blanca fluorescente durante el conteo de la germinación, pero por lo demás se mantuvieron en oscuridad dentro de las cámaras de incubación. El criterio para registrar germinación fue el crecimiento radicular de más de 2 mm y las semillas germinadas fueron retiradas después del conteo. La temperatura en cada cámara se registró en forma horaria durante el tiempo de incubación por medio de sensores de temperatura (RC – 30B *Temperature Data-Logger*, Schwyz).

### **2.2.3 Determinación de los parámetros térmicos que caracterizan el nivel de dormición de la población**

Los cambios en el nivel de dormición de las especies anuales de verano pueden ser cuantificados mediante cambios en la temperatura del límite inferior ( $T_l$ ) para la germinación de las semillas, la cual se distribuye normalmente en la población con una media ( $T_{l(50)}$ ) y su desviación estándar ( $\sigma_{Tl}$ ). Por lo tanto, se utilizaron estos parámetros térmicos ( $T_{l(50)}$  y  $\sigma_{Tl}$ ) como indicadores del nivel de dormición de la población de semillas (Washitani, 1987; Batlla y Benech-Arnold, 2015).

Las curvas de germinación obtenidas en cada momento de muestreo para semillas expuestas a diferentes temperaturas (ya sea al final del tratamiento de estratificación en frío para la salida de la dormición primaria, o durante la inducción en dormición

secundaria a través de estratificación en caliente) se analizaron utilizando el modelo matemático propuesto por Washitani (1987), posteriormente desarrollado por Kruk y Benech-Arnold (1998, 2000) y Batlla y Benech-Arnold (2003). Los parámetros térmicos se obtuvieron mediante el ajuste entre las curvas de germinación que simula el modelo y las curvas de germinación obtenidas experimentalmente para semillas exhumadas en diferentes momentos durante la inducción en dormición secundaria a 10, 15, 20, 25 y 30 °C que fueron incubadas a 10 y 15 °C. El modelo predice la dinámica de germinación de una población de semillas en función del tiempo y la temperatura y permite estimar dos tipos de parámetros térmicos de la población en relación con los datos de germinación observados: 1) los que describen el nivel de dormición de la población de semillas (es decir, la temperatura media del límite inferior ( $T_{l(50)}$ ) y temperatura media del límite superior ( $T_{h(50)}$ ) para la germinación y sus desviaciones estándar respectivas,  $\sigma_{Tl}$  y  $\sigma_{Th}$ , y 2) los que describen la relación entre la tasa de germinación y la temperatura (es decir, la temperatura base ( $T_b$ ), temperatura óptima ( $T_o$ ) y la temperatura máxima ( $T_m$ ) para la germinación, y el tiempo térmico requerido para la germinación ( $\theta$ ):

(1) La fracción de semillas con una temperatura del límite inferior ( $T_l$ ) y una temperatura del límite superior ( $T_h$ ), que germinará con una temperatura ( $T$ ) de incubación, es calculada a partir de la siguiente función de distribución:

$$G_i(T) = \left\{ \Phi \left[ \frac{T - T_{l(50)}}{\sigma_{Tl}} \right] - \left\{ 1 - \Phi \left[ \frac{T - T_{h(50)}}{\sigma_{Th}} \right] \right\} \right\} \quad \text{Ecuación (2.2)}$$

donde:  $G_i$  es la proporción de semillas a germinar a una  $T$  incubación dada y  $\Phi$  es la integral de la función normal de probabilidad.

(2) La dependencia de la tasa media de germinación ( $r$ ) para cada semilla en función de la temperatura se simula a partir de dos ecuaciones lineales con cuatro parámetros de germinación, e.j.  $T_b$ ,  $T_o$ ,  $T_m$ , y  $\theta$ :

para el rango sub-óptimo,

$$r = 1/\theta \bullet (T - T_b) \quad \text{Ecuación (2.3)}$$

para el rango supra-óptimo,

$$r = 1/\theta * (T - T_b) \bullet \left[ \frac{T_m - T}{T - T_o} \right] \quad \text{Ecuación (2.4)}$$

La distribución de  $\theta$  dentro de una la población de semillas puede ser descrita por la siguiente función de distribución:

$$F_i(\theta) = 1 - \left[ 3D^3(\theta - m + D)^3 + 1 \right]^{-1/2} \quad \text{Ecuación (2.5)}$$

donde  $m$  es la mediana de la distribución, es decir, el tiempo térmico requerido para que germine el 50% de la población, y  $D$  es la diferencia en unidades de tiempo térmico entre 0 y 50% de germinación.

Para estimar los parámetros térmicos de la población de semillas, se asumió que  $T_b$ ,  $T_o$  y  $T_m$  no varían durante el período de estratificación y durante la inducción en dormición secundaria, por lo que se fijaron valores de 0, 25 y 35 °C, respectivamente, que luego fueron utilizados para la optimización de los parámetros. Estos supuestos se basan en publicaciones anteriores de *P. aviculare* y otras especies de malezas anuales que

señalan que no hay variación de estos parámetros durante diferentes períodos de enterramiento en el suelo (Vleeshouwers, 1997; Bauer et al., 1998; Kruk y Benech-Arnold, 1998, 2000; Batlla y Benech-Arnold, 2003). Por otro lado, a los valores de los otros parámetros ( $T_1$ ,  $\sigma_{T1}$ ,  $T_h$ ,  $\sigma_{T_h}$  y  $\theta$ ) se les permitió variar dentro de un rango razonable, sobre la base de publicaciones anteriores para *P. aviculare* o especies anuales de verano que se encuentran en la literatura (Washitani, 1987; Bouwmeester, 1990; Kruk y Benech-Arnold, 1998; Batlla y Benech-Arnold, 2003).

#### 2.2.4 Evaluación del ajuste entre los datos observados y los pronosticados

Los parámetros térmicos óptimos para el modelo de germinación se obtuvieron mediante un método de ajuste de curva no lineal utilizando un programa de optimización (Solver for Nonlinear Programming 0.9, *Sun Microsystems, Inc.*). El ajuste máximo entre los datos simulados y obtenidos experimentalmente se logró por una técnica iterativa utilizando un algoritmo DEPS *Evolutionary algorithm*. El criterio estadístico utilizado para determinar los parámetros térmicos óptimos, fue el de minimizar la raíz del cuadrado medio del error (del inglés, *Root Mean Squared Error*-RMSE) de la simulación. El valor de RMSE utilizado para la optimización fue el promedio del RMSE resultante del ajuste de ambas curvas del régimen de germinación de la prueba de germinación:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{obs,i} - X_{model,i})^2}{n}} \quad \text{Ecuación (2.6)}$$

donde,  $X_{obs}$  son los valores observados y  $X_{model}$  son los valores pronosticados en el tiempo  $i$ .

#### 2.2.5 Generación del modelo de inducción en dormición

Para describir matemáticamente la relación entre la temperatura y la inducción en dormición secundaria, se estableció una relación funcional entre el tiempo de inducción en la población de semillas y las temperaturas que inducen dormición secundaria (10 – 30 °C). Como se ha señalado anteriormente, la inducción en dormición secundaria en semillas de *P. aviculare* se puede cuantificar a través de cambios en  $T_{1(50)}$ , por lo que este parámetro térmico fue utilizado como un indicador del nivel de dormición de la población de semillas (Batlla y Benech-Arnold, 2003). A continuación se resume el desarrollo del modelo:

- (1) Determinar los parámetros térmicos de la población de semillas que maximicen el ajuste entre las curvas de germinación obtenidas experimentalmente, utilizando el protocolo de germinación que se ha descrito anteriormente para las semillas que han sido inducidas en dormición secundaria a 10, 15, 20, 25 y 30 °C y las curvas de germinación simuladas obtenidas a partir del modelo matemático de germinación para cada tiempo de inducción.
- (2) caracterizar los cambios en  $T_{1(50)}$  de la población de semillas en el tiempo para las semillas inducidas en dormición secundaria a diferentes temperaturas; sobre la base de esta caracterización, las respuestas a diferentes temperaturas se unificarán usando una escala de tiempo térmico. El modelo no tiene en cuenta los cambios significativos en  $\sigma_{T1}$  durante la inducción en dormición.
- (3) Validar el modelo desarrollado en (2) utilizando datos de un experimento independiente, como se explica a continuación.

### 2.2.6 Evaluación del modelo

El funcionamiento del modelo se evaluó a partir de un conjunto de datos independientes obtenidos con experimentos realizados bajo condiciones de temperatura controlada. Las semillas de *P. aviculare* se recolectaron en Balcarce, Argentina, durante marzo de 2014 al momento de la dispersión natural. En septiembre de 2014, se colocaron grupos de aproximadamente 200 semillas en bolsas de malla de nylon que fueron enterradas a 5 cm de profundidad en macetas (como en los tratamientos de las condiciones que inducen dormición secundaria descritos anteriormente) y se expusieron a tres temperaturas de estratificación (1,6, 5 y 10 °C). Las semillas fueron exhumadas (cuatro replicas por exhumación) después de acumular las mismas unidades térmicas de estratificación en grados-día (°Cd) (es decir, 500, 1000 y 1500 °Cd) de acuerdo con la ecuación (2.1). Después de que las semillas habían acumulado 1500 °Cd (semillas con un bajo nivel de dormición) se almacenaron durante 20 d a 20 °C para inducir las semillas en dormición secundaria. Durante el almacenaje a 20 °C, la germinación de semillas fue evaluada a temperaturas constantes de 10 y 15 °C a diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4, 8, 12 y 20 d). Las curvas de germinación obtenidas a partir de los datos independientes durante la inducción de inducción se utilizaron para validar el modelo.

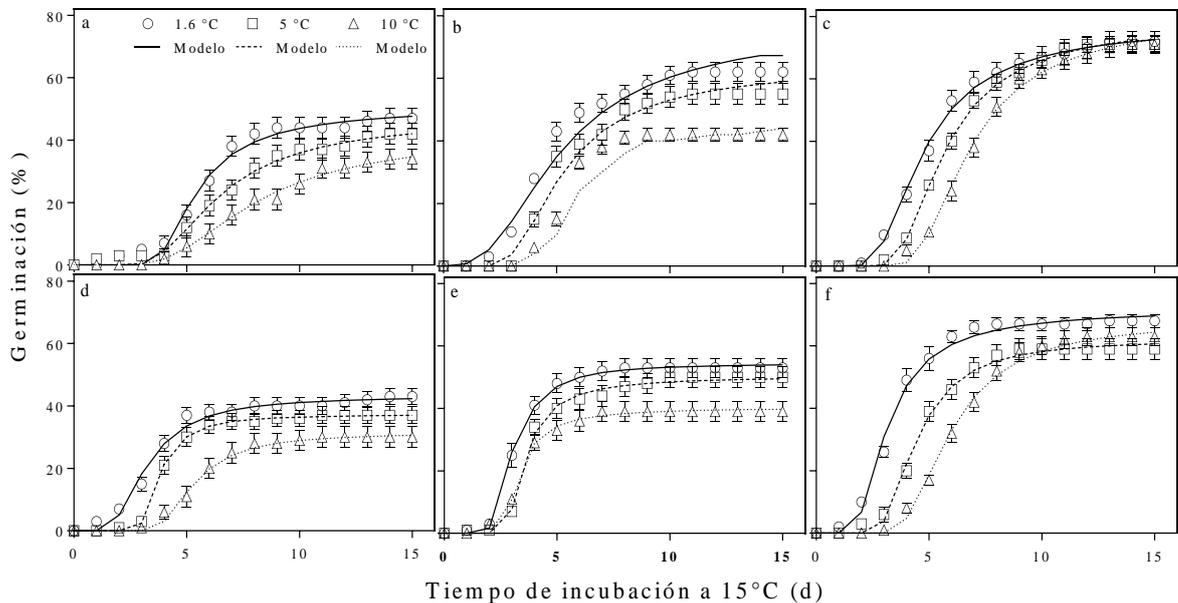
## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Parámetros térmicos de la población de semillas durante la salida de la dormición primaria y la inducción en dormición secundaria

Las dinámicas de germinación a 10 y 15 °C para semillas que acumularon diferente cantidad de tiempo térmico de estratificación según la ecuación (2.1) (0, 500, 1000 y 1500 °Cd) durante el tiempo de estratificación a 1.6, 5 y 10 °C, se muestran en la figura (2.1). El aumento del tiempo de exposición a las tres temperaturas de estratificación resultó en un aumento progresivo en los valores de germinación y, por lo tanto, se observó una disminución progresiva de  $T_{l(50)}$  durante la estratificación (Fig 2.1; Cuadro 2.1). Al final del periodo de estratificación a las tres temperaturas de almacenamiento (1500 °Cd), las semillas alcanzaron un nivel "mínimo" de dormición logrando porcentajes altos de germinación en ambas temperaturas de incubación y un valor de  $T_{l(50)} = 7,5$  °C (Cuadro 2.1; Fig. 2.1); este punto representa el día 0 para todos los experimentos de inducción en dormición secundaria.

Para inducir las semillas en dormición secundaria, las semillas previamente estratificadas a 5 °C se almacenaron a 10, 15, 20, 25 y 30 °C durante diferentes períodos de tiempo. Los valores de porcentaje de germinación observados para semillas exhumadas en diferentes momentos durante el almacenamiento e incubadas a 10 y 15 °C fueron dependientes de la temperatura de almacenamiento (Fig. 2.2). Las temperaturas más bajas de almacenamiento (10 y 15 °C) indujeron las semillas en dormición secundaria más lentamente que temperaturas más altas (20, 25 y 30 °C). Se observó un aumento progresivo dependiente de la temperatura en  $T_{l(50)}$  para las semillas almacenadas a todas las temperaturas durante la inducción en dormición secundaria (10 – 30 °C), mientras que los valores de  $\sigma_{TI}$  mostraron apenas cambios menores (Fig. 2.3 a; Cuadro 2.2). Sin embargo, las semillas almacenadas a 10 °C mostraron un patrón diferente de comportamiento: durante los primeros 20 días de almacenamiento las semillas fueron inducidas ligeramente en dormición secundaria (es decir, se observó un leve aumento de  $T_{l(50)}$ ); a partir de ahí y hasta 34 días de almacenamiento, la salida de la dormición fue el proceso predominante, lo que aumentó los valores de germinación (27d a 10 °C = 35%;

15 °C = 23% y 34d a 10 °C = 48%; 15 °C = 35%) revirtiendo el aumento en el valor de  $T_{l(50)}$ .



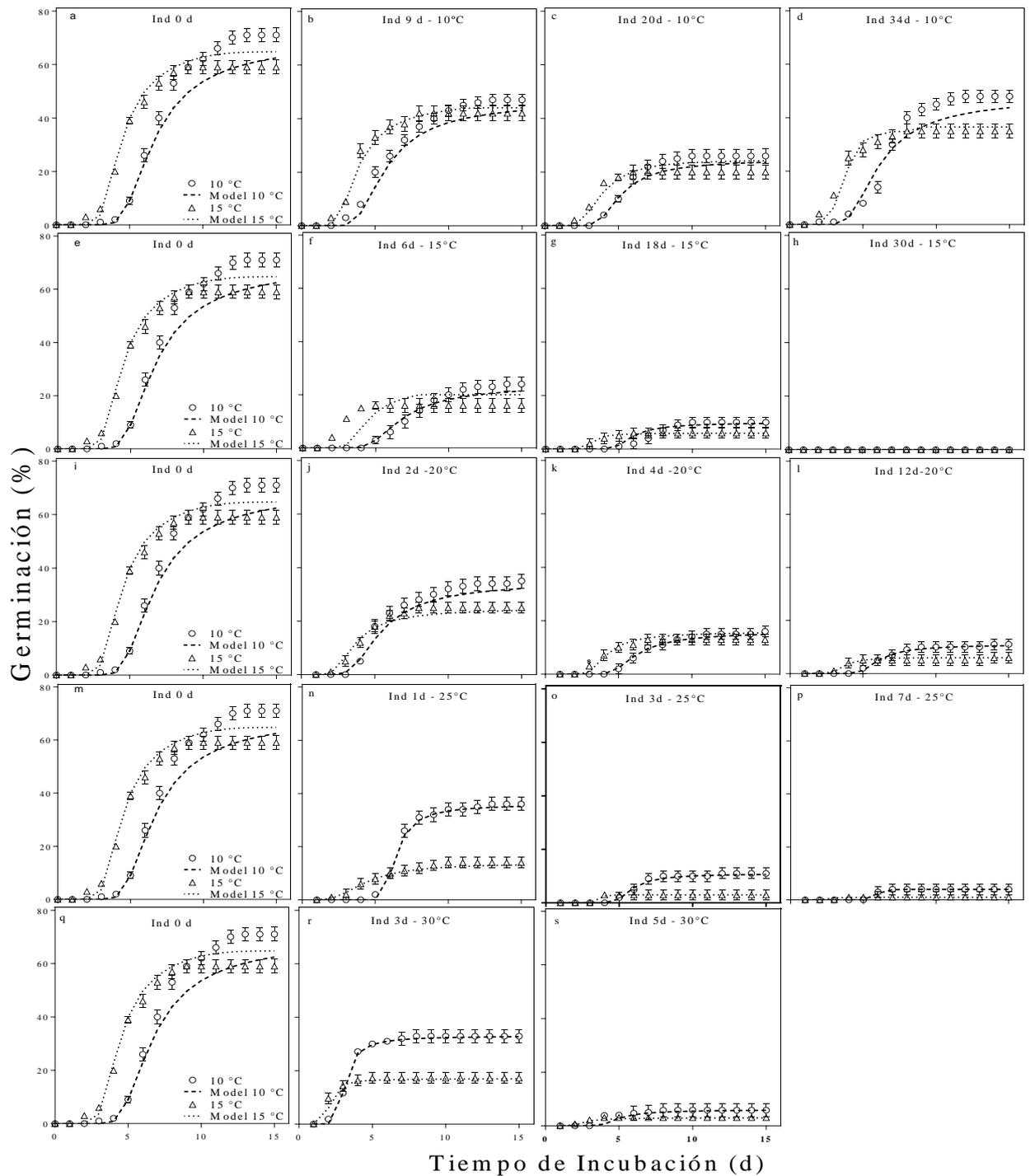
**Figura 2.1** Curvas de germinación acumulada observada a temperaturas de incubación de 10 °C (a, b, c) y 15 °C (d, e y f) para semillas de *P. aviculare* estratificadas a 1,6 °C (○), 5 °C (□) y 10 °C (△) que habían acumulado diferentes cantidades de tiempo térmico de estratificación: 500 °Cd (a, d), 1000 °Cd (b, e) y 1500 °Cd (d, f). Las líneas continuas y punteadas representan las curvas de germinación simuladas usando las ecuaciones descritas para el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.

Las ecuaciones del modelo (Ecs. 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5) fueron capaces de dar una buena descripción de los cambios en las curvas de germinación durante la salida de la dormición primaria (Fig. 2.1; Cuadro 2.1). Durante la inducción en dormición secundaria, por el contrario, las ecuaciones del modelo dieron una buena descripción de los cambios en las curvas de germinación, pero sólo para las semillas que se incubaron a 15 °C, mientras que a 10 °C el modelo subestimó la germinación (datos no mostrados). Esta subestimación puede ser probablemente una consecuencia de la incubación a 10 °C que promueve la salida de la dormición, como se ha informado anteriormente para *P. aviculare* por Batlla y Benech-Arnold (2015). Cuando las semillas son incubadas a bajas temperaturas, la salida de la dormición primaria durante el período de incubación puede llevarse a cabo y de este modo estimular la germinación más allá de lo que podría haberse esperado si no se hubieran producido cambios en el nivel de dormición durante la incubación (Batlla y Benech-Arnold, 2015). Con el fin de corregir esta situación, se simuló la germinación a 10 °C nuevamente, pero teniendo en cuenta que las semillas acumularon una cierta cantidad de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) durante el período de incubación de acuerdo con la ecuación (2.1). La acumulación de estas  $S_{tt}$  unidades determinaron una disminución de  $T_{l(50)}$  en relación con la considerada anteriormente sin tener en cuenta el efecto de la salida de la dormición durante la incubación. Usando este nuevo valor de  $T_{l(50)}$ , las curvas de germinación simuladas por el modelo mostraron un mejor ajuste a los cambios en el comportamiento de la germinación durante la inducción en dormición para semillas incubadas a 10 °C (es decir, la simulación

de 9d de inducción a 10 °C mostró un  $R^2$  inicial = 0,35 y con la corrección mostró un  $R^2$  = 0,85) (Fig. 2.1 y 2.2). Por sobre todo, esto demuestra que el modelo es lo suficientemente robusto y apoya la credibilidad de los parámetros térmicos que se pueden derivar de el mismo. Debido al efecto múltiple de 10 °C como temperatura de incubación (es decir, efecto tanto en la salida de la dormición como en la tasa de germinación), sólo los parámetros ( $T_{l(50)}$  y  $\sigma_{Tl}$ ) derivados de incubaciones a 15 °C se utilizaron para construir el modelo descrito abajo.

**Cuadro 2.1** Estimación de los parámetros térmicos para la población de semillas de *P. aviculare* durante la salida de la dormición primaria a diferentes temperaturas de estratificación (1,6, 5 y 10 °C). Los parámetros térmicos ( $T_{l(50)}$ ,  $\sigma_{Tl}$ ,  $T_{h(50)}$ ,  $\sigma_{Th}$ ) se obtuvieron a partir de datos de germinación obtenidos experimentalmente a temperaturas constantes de 10 y 15 °C a través del ajuste de las curvas de germinación simuladas para semillas estratificadas a 1,6, 5 y 10 °C que acumularon la misma cantidad de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$  = °Cd). La simulación se realizó utilizando las ecuaciones descritas en el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Se asumió que  $T_b$ ,  $T_o$  y  $T_m$  no varían durante el período de la estratificación, los valores de 0, 25 y 35 °C, fueron ajustados respectivamente y utilizados. El guion significa que la estimación de los parámetros térmicos de población no fue posible debido a la muy baja germinación durante la prueba inicial (germinación observada <2%). El valor de RMSE fue calculado como un estimador de la bondad del ajuste entre los valores de germinación observados y simulados (Ecn.2. 6).

Temp (°C)	$S_{tt}$ (°Cd)	$T_{l(50)}$	$\sigma_{Tl}$	$T_{h(50)}$	$\sigma_{Th}$	RMSE
1,6	0	-	-		-	-
	500	14,5	1,5		1,8	39,5
	1000	12,5	1,5	18	0,9	41,2
	1500	7,5	1,5		0,8	10,1
5	0	-	-		-	-
	500	15,0	4		0,2	22,1
	1000	12,0	4	18	2,0	27,1
	1500	7,57	4		0,7	22,2
10	0	-	-		-	-
	500	15,1	5.2		2,0	21,8
	1000	12,6	5.2	18	0,8	37,7
	1500	7,53	5.2		0,6	27,3



**Figura 2.2** Semillas de *P. aviculare* inducidas en dormición secundaria. Curvas de germinación simuladas (línea punteada) y observadas (símbolos) de semillas incubadas a temperaturas constantes de 10 °C (○) y 15 °C (△) después de diferentes días de inducción en dormición secundaria a 10 °C (a, b, c, d), 15 °C (e, f, g, h), 20 °C (i, j, k, l), 25 °C (m, n, o, p) y 30 °C (q, r, s). Previamente a la inducción en dormición las semillas fueron estratificadas a 5 °C durante 125 días ( $S_H = 1500$  °Cd) hasta obtener un mínimo de dormición. Los datos de germinación fueron simulados utilizando las ecuaciones del modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no se muestran las barras se muestra que el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.

**Cuadro 2.2** Estimación de los parámetros térmicos para la población de semillas de *P. aviculare* durante la inducción en dormición secundaria a diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25 y 30 °C). Los parámetros térmicos ( $T_{l(50)}$ ,  $\sigma_{Tl}$ ,  $T_{h(50)}$ ,  $\sigma_{Th}$ ) se obtuvieron a partir de datos de germinación obtenidos experimentalmente a temperaturas constantes de 10 y 15 °C mediante el ajuste de las curvas de germinación simuladas para las semillas que han sido inducidas en dormición secundaria a las diferentes temperaturas (10 – 30 °C) y diferentes días. La simulación se realizó utilizando la ecuación descrita en el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Se asumió que los valores de  $T_b$ ,  $T_o$  y  $T_m$  no variaron durante la inducción en dormición secundaria, los valores se fijaron en 0, 25 y 35 °C, respectivamente, luego fueron utilizados. El día 0 representa el punto con el mínimo nivel de dormición al momento de la inducción. El valor de RMSE fue calculado como un estimador de la bondad del ajuste entre los valores de germinación observados y simulados (Ecn. 2.6).

Temp (°C)	Induc (d)	$T_{l(50)}$	$\sigma_{Tl}$	$T_{h(50)}$	$\sigma_{Th}$	RMSE
10	0	7,5	4		0,8	22,2
	9	9,3	2,8		1,2	26,5
	14	11	4	18	1,0	27,6
	20	12,7	4,3		1,1	31,3
	27	12	4,6		1,1	28,4
	34	10,2	3,3		1,6	33,8
15	0	7,5	4		0,8	22,2
	6	10,8	3,4		0,8	31,9
	13	14,7	4,8	18	1,2	20,6
	18	15,6	4,6		0,6	23,3
	24	16,8	3,5		0,8	21,1
	30	17,7	4,1		1,3	19,2
20	0	7,5	4		0,8	22,2
	2	9,8	4,1		2,9	30,9
	4	12,4	3,8		2,9	31,0
	8	14,8	4	18	3,0	31,8
	12	16,5	4,6		1,8	19,8
	16	18	3,2		0,8	-
25	0	7,5	4		0,8	22,2
	1	10,2	4,7		0,9	41,6
	3	14,5	4,9	18	2,1	25,6
	5	17,1	4,5		1,6	28,4
	7	18	4,1		2,3	-
30	0	7,5	4		0,8	22,2
	1	12,5	4,3	18	3,6	14,4
	3	17,8	4,1		4,8	-

### 2.3.2 Modelo de inducción en dormición secundaria

Una relación cuantitativa entre la temperatura de inducción, el tiempo de almacenamiento y el nivel de dormición fue establecida a través de cambios en  $T_{l(50)}$  durante la inducción en dormición secundaria (Fig. 2.3 a). La cuantificación de los

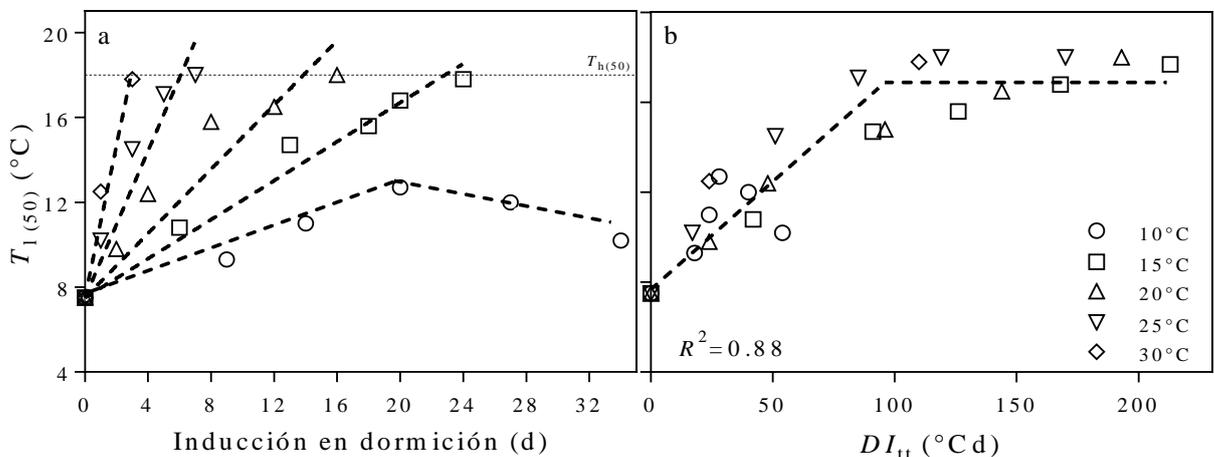
parámetros térmicos obtenidos de semillas estratificadas a 5 °C y luego re-inducidas en dormición secundaria a 10, 15, 20, 25 y 30 °C, permitió el desarrollo de un modelo simple de tiempo térmico que se basa en la acumulación de grados días por encima de una temperatura umbral para que la inducción en dormición secundaria tenga lugar. Este modelo es análogo al modelo de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) desarrollado por Batlla y Benech-Arnold (2003). Para tener en cuenta el efecto de las temperaturas de inducción sobre el nivel de dormición de la población de semillas, los cambios en  $T_{l(50)}$  se cuantificaron como una función de la acumulación de unidades de tiempo térmico de inducción en dormición secundaria ( $DI_{tt}$ ) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$DI_{tt} = \text{Días} \cdot (T_s - T_{uDI}) \quad \text{Ecuación (2.7)}$$

donde  $DI_{tt}$  es el tiempo térmico de inducción en dormición secundaria (°Cd),  $T_{uDI}$  es la temperatura umbral para la inducción en dormición secundaria (temperatura a la cual o debajo de la cual la inducción en dormición no se produce) y  $T_s$  es la temperatura media diaria de almacenamiento. La óptima  $T_{uDI}$  se obtuvo utilizando diferentes valores de este parámetro hasta que el mejor ajuste de la regresión bi-lineal entre  $T_{l(50)}$  y  $DI_{tt}$  fue alcanzado: El mejor ajuste ( $R^2 = 0,88$ ) entre  $T_{l(50)}$  y  $DI_{tt}$  fue obtenido con una  $T_{uDI} = 7,9$  °C (Fig. 2.3 b). Con la ecuación siguiente es posible predecir cambios en  $T_{l(50)}$  durante la inducción en dormición secundaria:

$$T_{l(50)} = 0.12 \cdot DI_{tt} + 7.5 \quad \text{Ecuación (2.8)}$$

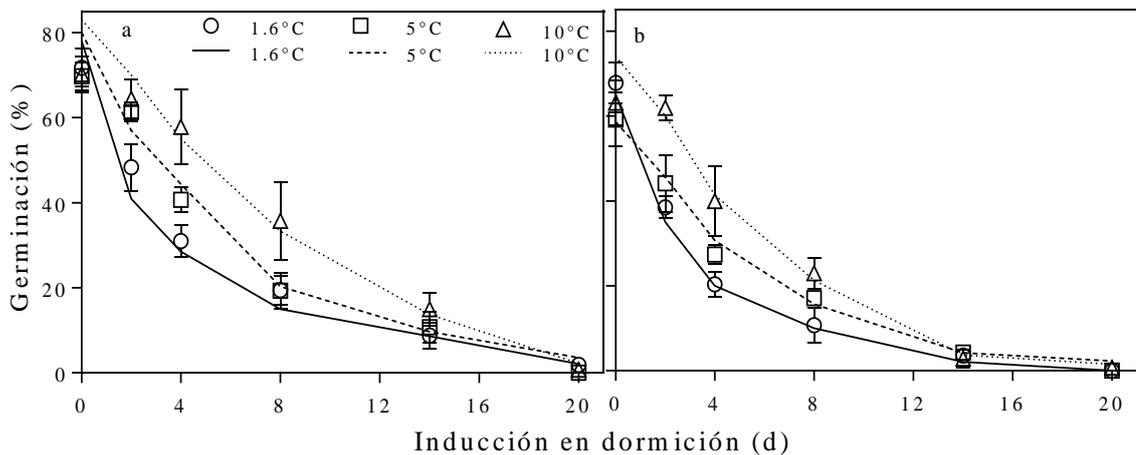
donde 7.5 es la  $T_{l(50)}$  inicial para una población de semillas después de acumular  $S_{tt} = 1500$  °Cd (bajo nivel de dormición).



**Figura 2.3** Representación de los valores de la temperatura del límite inferior ( $T_{l(50)}$ ) para semillas de *P. aviculare* inducidas en dormición a diferentes temperaturas 10 °C (○), 15 °C (□), 20 °C (△), 25 °C (▽) y 30 °C (◇) (derivada de las curvas simuladas mostradas en la Fig. 2.2), en función de los días de inducción (a), y en función del tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) (b). Las líneas punteadas en (a) se ajustaron mediante ecuaciones lineales para cada temperatura de almacenamiento con valores de  $R^2$  de 0,96 (10 °C), 0,99 (15 °C), 0,87 (20 °C), 0,89 (25 °C) y 0,96 (30 °C), respectivamente ( $P$ -value = < 0.0001, test de pendientes, para verificar que las pendientes son significativas diferentes). La bi-lineal ajustada en (b) es el resultado de un análisis de repetidas regresiones para obtener la 'temperatura de inducción en dormición umbral' ( $T_{uDI}$ ) con el mejor ajuste de acuerdo a la ecuación (2.7). Los valores de los parámetros correspondientes a la ecuación (2.8) son la pendiente ( $T_{l(50)}$  tasa de incremento) =  $0,12 \pm 0,0179$  °C por °Cd y la intersección del eje y (inicial  $T_{l(50)}$  de la población de semillas con mínima dormición) =  $7,5 \pm 0,7$  °C.

### 2.3.3 Validación del modelo

La performance del modelo de inducción en dormición secundaria se evaluó usando datos de un experimento independiente en condiciones controladas en las que las semillas se estratificaron a diferentes temperaturas (1,6, 5 y 10 °C) y después fueron inducidas en dormición a 20 °C durante 20d (Fig. 2.4). Para contrastar los resultados del modelo con los datos experimentales independientes, cambios en  $T_{l(50)}$  durante la inducción en dormición a 20 °C fueron simulados utilizando las ecuaciones del modelo de inducción en dormición secundaria (Ecs. 2.7 y 2.8). Una vez que los valores de  $T_{l(50)}$  se estimaron, los cambios en los porcentajes finales de germinación de las semillas incubadas a 10 y 15 °C por 15d durante la inducción en dormición a 20 °C fueron predichos utilizando las ecuaciones del modelo de germinación previamente descritas (Ecs. 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5). Para simular las curvas de germinación, se partió del supuesto de que los parámetros de germinación se mantienen constantes durante la inducción en dormición (i.e. valores fijos de  $T_b = 0$  °C,  $T_o = 25$  °C y  $T_m = 35$  °C fueron usados) (Washitani, 1987; Bouwmeester, 1990; Kruk y Benceh-Arnold, 1998; Batlla y Benceh-Arnold 2003, 2015).



**Figura 2.4** Porcentajes de germinación final predichos (líneas) y observados (símbolos) a temperaturas de incubación de 10 °C (a) y 15 °C (b) para semillas de *P. aviculare* previamente estratificadas a 1,6 °C (○), 5 °C (□) y 10 °C (△) ( $S_{tt} = 1500$  °Cd) y después expuestas a 20 °C durante 20 días. Los valores predichos fueron simulados utilizando las ecuaciones descritas en el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5) para temperaturas de almacenamiento de 1,6 °C (línea continua), 5 °C (línea discontinua) y 10 °C (línea de puntos). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no se muestran las barras se muestra que el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.

Los resultados experimentales independientes demostraron que la tasa de inducción en dormición a una temperatura de almacenamiento de 20 °C era dependiente de la temperatura a la que se habían estratificado las semillas: semillas previamente expuestas a bajas temperaturas de estratificación (1,6 °C) mostraron una tasa de inducción en dormición más alta que las semillas que se estratificaron a temperaturas más altas (5 y 10 °C) (Fig. 2.5 y 2.6). El modelo asume que  $\sigma_{TI}$  no varía durante la inducción en dormición, por lo tanto, los valores de  $\sigma_{TI}$  obtenidos al final del período de estratificación a cada temperatura se mantuvieron constantes durante el período de inducción en dormición para la simulación (es decir, 1,6 °C [ $\sigma_{TI} = 1,5$ ], 5 °C [ $\sigma_{TI} = 4$ ] y 10 °C [ $\sigma_{TI} = 5,2$ ]) (Cuadro 2.3).

Estas diferencias entre  $\sigma_{TI}$  al comienzo del proceso de inducción, junto con el aumento de  $T_{l(50)}$  en las semillas que habían sido estratificadas a 1,6, 5 y 10 °C (Fig. 2.6), determinaron que durante los primeros cuatro días de almacenamiento a 20 °C, la tasa de inducción en dormición secundaria fuera más rápida en las semillas que habían sido estratificadas a bajas temperaturas (es decir, 1,6 °C) que en las que habían sido estratificadas a altas temperaturas (es decir, 5 y 10 °C). Esta notable diferencia en el porcentaje de germinación final fue explicada por el modelo, tanto a partir de la forma de la curva de distribución poblacional (es decir, el valor de  $\sigma_{TI}$ ), como por el desplazamiento de la distribución  $T_{l(50)}$  para cada condición de almacenamiento (Fig. 2.6). Estos resultados sugieren que la temperatura experimentada por las semillas durante la salida de la dormición primaria puede afectar a la tasa de la posterior inducción en dormición secundaria y que estos efectos podrían explicarse por cambios en  $\sigma_{TI}$  para la germinación de las semillas. Estos parámetros podrían dar una explicación de la naturaleza del efecto de la temperatura de estratificación previa sobre la tasa de entrada en dormición secundaria.

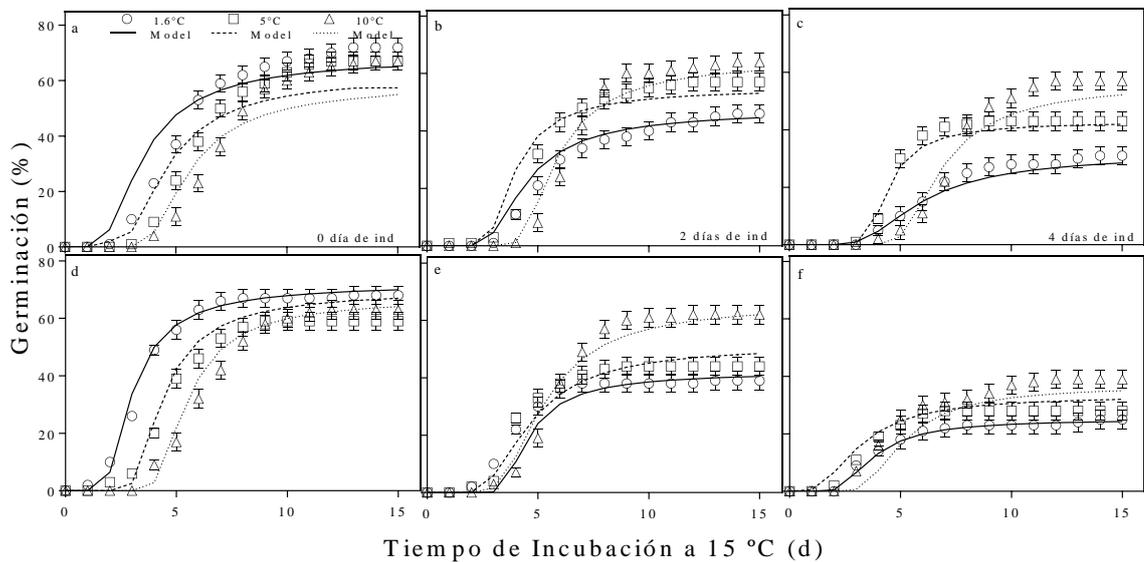
**Cuadro 2.3** Estimación de los parámetros térmicos de la población de semillas para *P. aviculare* al final del período de estratificación a las diferentes temperaturas (0 días representa el punto con el mínimo nivel de dormición ( $S_{tt} = 1500$  °Cd)) y durante la inducción en dormición secundaria a 20 °C (2 y 4d). Los parámetros térmicos ( $T_{l(50)}$ ,  $\sigma_{TI}$ ,  $T_{h(50)}$ ,  $\sigma_{Th}$ ) se obtuvieron a partir de datos de germinación obtenidos experimentalmente a temperaturas constantes de 10 °C (panel **a**) y 15 °C (panel **b**) mediante el ajuste de las curvas de germinación simuladas para las semillas que han sido inducidas en dormición secundaria a 20 °C. La simulación se realizó utilizando la ecuación descrita en el modelo de germinación desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). El valor de RMSE fue calculado como un estimador de la bondad del ajuste entre los valores de germinación observados y simulados (Ecn. 2.6).

Temp $S_{tt}$ (°C)	(a) Ind a 20 °C (10 °C Temp de Incubación)						(b) Ind a 20 °C (15 °C Temp de Incubación)				
	Días a 20 °C	$T_{l(50)}$	$\sigma_{TI}$	$T_{h(50)}$	$\sigma_{Th}$	RMSE	$T_{l(50)}$	$\sigma_{TI}$	$T_{h(50)}$	$\sigma_{Th}$	RMSE
1,6	0	7,5	1,5	18	4,3	11	7,5	1,5	18	4,2	2,7
	2	10,1	1,5	18	0,2	1,5	15,1	1,5	18	0,1	1,7
	4	10,7	1,5	18	0,1	1,6	16	1,5	18	0,1	8,8
5	0	7,5	4	18	0,4	2,4	7,5	4	18	0,4	2,6
	2	9,1	4	18	0,1	1,3	13,4	4	18	4,5	1,6
	4	10,5	4	18	0,2	2,7	16,7	4	18	4,7	2,3
10	0	7,5	5,2	18	3,5	6,6	7,5	5,2	18	3,5	2,3
	2	7,8	5,2	18	1,2	3,2	12,8	5,2	18	4,9	14,3
	4	8,7	5,2	18	4,8	6,5	16,9	5,2	18	2,9	10,8

## 2.4 Discusión

La temperatura del suelo ha sido considerada como el factor principal que controla los cambios estacionales en el nivel de dormición en semillas de *P. aviculare* en condiciones naturales (Courtney, 1968; Kruk y Benech-Arnold, 1998; Benech-Arnold et al., 2000; Batlla y Benech-Arnold, 2003). Estos cambios estacionales en el nivel de dormición están relacionados con cambios en el rango de condiciones ambientales dentro del cual las semillas son capaces de germinar (Bouwmeester y Karszen, 1992; Vleeshouwers y Kropff, 2000; Bewley et al., 2013). Si bien se han desarrollado varios modelos de germinación con el fin de predecir con cierta exactitud el momento de emergencia de las malezas en función de la temperatura, rara vez se consideran cambios

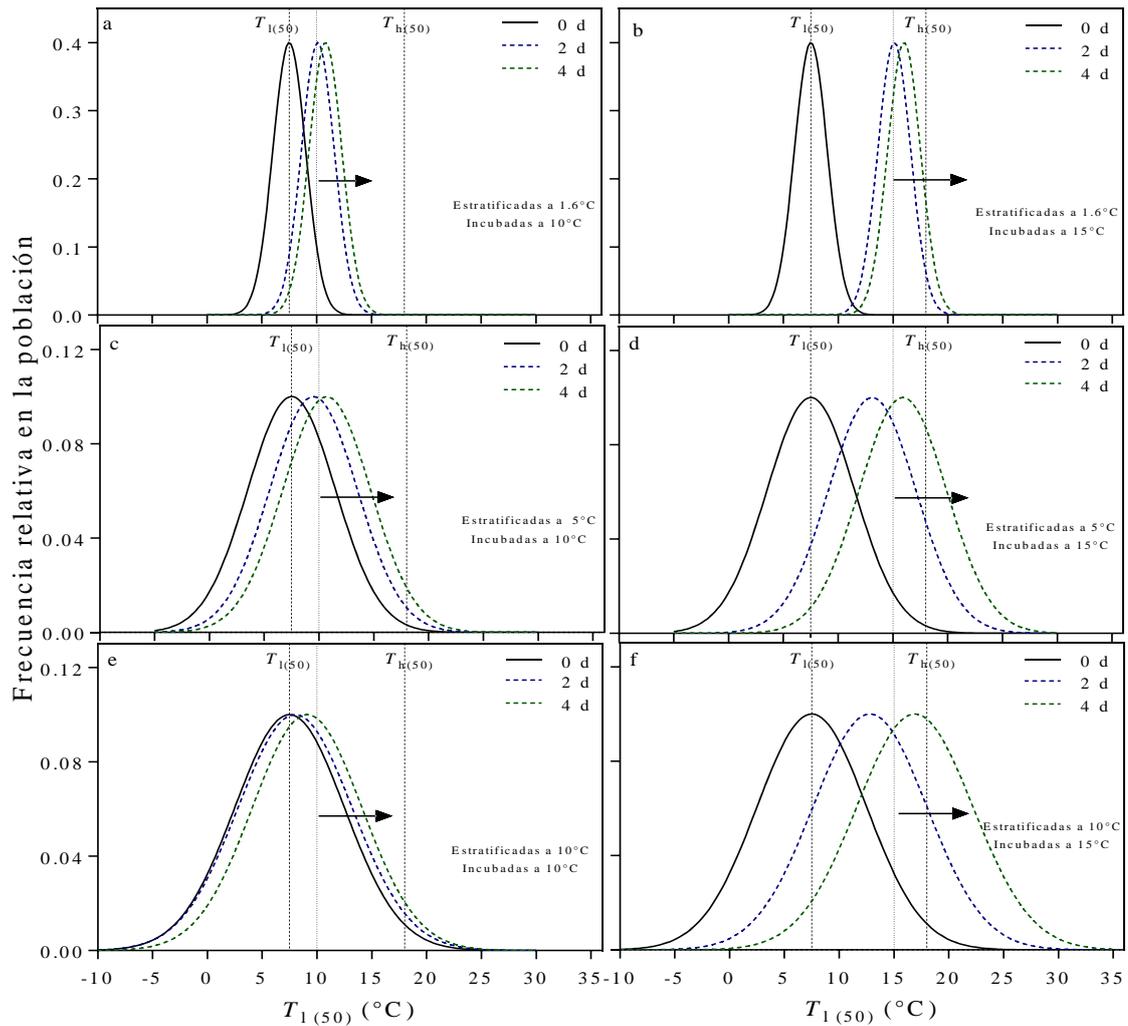
en el nivel dormición de las semillas; esto se debe principalmente a la dificultad de evaluar cuantitativamente la dormición (Bouwmeester, 1990; Bouwmeester y Karssen, 1992; 1993; Murdoch, 1998; Kebreab y Murdoch, 1999). Por ejemplo, en algunos trabajos se considera el porcentaje final de germinación en un momento determinado como una cuantificación de la dormición; esto conduce a errores graves ya que este valor no sólo cambia con la dormición, sino también con la temperatura de incubación. De hecho, la dormición es un fenómeno relativo y se expresa diferencialmente en diferentes fracciones de la población de semillas en función de la temperatura de incubación (Batlla y Benech-Arnold, 2015). Los conceptos de "temperatura del límite inferior ( $T_l$ )" y "temperatura del límite superior ( $T_h$ )" introducidos por Washitani (1987) pueden explicar esta expresión de la dormición dependiente de la temperatura durante la incubación y se han utilizado ampliamente en trabajos anteriores en *P. aviculare* como una forma de evaluar cuantitativamente la dormición (Batlla y Benech-Arnold, 2003). De esta manera, a medida que las semillas salen de la dormición,  $T_{l(50)}$  disminuye gradualmente demostrando así el incremento en la capacidad de la población para germinar a bajas temperaturas (Batlla y Benech-Arnold, 2003; Arana et al., 2015).



**Figura 2.5** Curvas de germinación simuladas con curvas obtenidas a partir de datos experimentales durante la inducción en dormición secundaria a 20 °C para semillas de *P. aviculare* previamente estratificadas a 1,6 °C (○), 5 °C (□) y 10 °C (Δ). Curvas de germinación simuladas (línea continua y discontinua) y observadas (símbolos) para semillas de *P. aviculare* incubadas a 10 °C (a, b, c) y 15 °C (d, e y f) después de haber sido expuestas a 20 °C durante 0, 2 y 4d. Los valores predichos fueron simulados utilizando las ecuaciones descritas en el modelo desarrollado por Washitani (1987) (Ecs. 2.2 – 2.5). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no se muestran las barras se muestra que el valor del error estándar de la media es menor que el tamaño del símbolo.

En este Capítulo se muestra que la inducción en dormición secundaria en semillas de *P. aviculare* puede también ser evaluada cuantitativamente a través de cambios en  $T_{l(50)}$ , después de alcanzar un nivel de dormición "mínimo", evidenciado por un valor bajo de  $T_{l(50)}$  (Cuadro 2.1; Fig. 2.1); si las semillas son expuestas a temperaturas por encima de 10 °C, la  $T_{l(50)}$  aumenta rápidamente hasta alcanzar valores cercanos a  $T_{h(50)}$  (es decir, la dormición se expresa en todas las temperaturas, una situación que puede ser considerada como una definición funcional de "dormición absoluta") (Cuadro 2.2; Fig. 2.3). Los resultados de este Capítulo también mostraron que la tasa con la que la  $T_{l(50)}$  se

incrementa, depende de la temperatura a la cual las semillas se expusieron durante la inducción en dormición secundaria; cuanto mayor es la temperatura, más alta es la tasa de incremento de  $T_{l(50)}$  (Fig. 2.3 a). También se demostró que la salida de la dormición primaria a través de las temperaturas de estratificación en esta especie es dependiente de la temperatura,  $T_{l(50)}$  disminuye más rápidamente (es decir, las semillas salen de la dormición a una tasa mayor) si las temperaturas de estratificación están bien por debajo del umbral de temperatura de 17 °C, temperatura a la cual o por encima de la cual la salida de la dormición no ocurre (Batlla y Benech-Arnold, 2003).



**Figura 2.6** Cambios en la distribución de la frecuencia normal de  $T_{l(50)}$  dentro de una población de semillas de *P. aviculare* previamente estratificadas a 1,6 °C (a, b), 5 °C (c, d) y 10 °C (e, f) hasta alcanzar un mínimo nivel de dormición ( $S_{tt} = 1500$  °Cd) y, posteriormente, inducidas en dormición secundaria a 20 °C durante 0, 2 y 4d. Los valores estimados para los parámetros térmicos ( $T_{l(50)}$  y  $\sigma_{Tl}$ ) se obtuvieron a través de la reproducción mediante la simulación de las curvas de germinación para las semillas expuestas a 20 °C y después incubadas a temperaturas constantes de 10 °C (línea vertical discontinua) o 15 °C (línea vertical discontinua). El valor inicial de  $T_{l(50)}$  antes de exponerlas a 20 °C fue de 7,5 °C para las semillas estratificadas a todas las temperaturas. El valor inicial de  $\sigma_{Tl}$  era  $\sigma_{Tl} = 1,5$ ,  $\sigma_{Tl} = 4$  y  $\sigma_{Tl} = 5,2$  para las semillas estratificadas a 1,6 °C, 5 °C y 10 °C, respectivamente, y se asume que no cambia a lo largo de la inducción en dormición secundaria.

La identificación de este umbral de temperatura permitió el desarrollo de un "índice de tiempo térmico de estratificación" ( $S_{tt}$ ); los cambios en la  $T_{l(50)}$  estuvieron lineal

y negativamente relacionados con la acumulación de  $S_{tt}$ . Esta relación es una descripción formal de los cambios en el nivel de dormición en función del ambiente térmico y puede incorporarse a los modelos predictivos de *P. aviculare* (Batlla y Benech-Arnold, 2003). De una manera análoga, la dependencia de la temperatura sobre la inducción en dormición secundaria pudo ser descrita formalmente en este capítulo por medio de: i) la identificación de una temperatura umbral para que la inducción en dormición secundaria sea inducida (7,9 °C); ii) el desarrollo de un Índice de Tiempo Térmico de inducción en Dormición ( $DI_{tt}$ ); iii) el establecimiento de una relación bi-lineal y positiva entre  $T_{l(50)}$  y la acumulación de  $DI_{tt}$  (Fig. 2.3 b). Juntos, estos dos índices de tiempo térmico ( $S_{tt}$  y  $DI_{tt}$ ) pueden ser utilizados para evaluar cuantitativamente la relación entre la temperatura y los cambios en el nivel de dormición durante la salida de la dormición primaria y la inducción en dormición secundaria, lo que permite determinar el rango de temperaturas permisivas para la germinación como consecuencia de cambios en la  $T_{l(50)}$ . En otras palabras, los cambios cíclicos en el nivel de dormición en condiciones de campo se podrían predecir adecuadamente con el uso combinado de estos dos índices. De hecho, su performance ha sido validada con datos independientes, por separado:  $S_{tt}$  por Batlla y Benech-Arnold (2003) y  $DI_{tt}$  en este Capítulo (Fig. 2.4).

El valor umbral de la “temperatura de inducción en dormición” ( $T_{uDI}$ ) identificado en este capítulo fue de 7,9 °C. Esto significa que las semillas serían inducidas en dormición secundaria si la temperatura es superior a este valor con una tasa que sería mayor cuanto mayor es la temperatura. Valores de umbral similares fueron reportados por Batlla et al. (2009) y por Vleeshouwers y Bouwmeester (2001) quienes determinaron un valor de temperatura mínimo para la inducción de la dormición (valor por debajo del cual la inducción en dormición no ocurre) de 8,1 °C y 8,9 °C, para *Polygonum persicaria* y *Chenopodium album*, respectivamente. Sorprendentemente, este valor umbral de 7,9 °C para la inducción en dormición está muy por debajo de la temperatura umbral para la salida de la dormición que había sido determinada por Batlla y Benech-Arnold (2003) que es de 17 °C. Esto implica la existencia de un rango de temperaturas entre 7,9 °C y 17 °C en el que ambos procesos, salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria, tendrían lugar al mismo tiempo. De hecho, no sólo nos vimos obligados a corregir los valores de  $T_{l(50)}$  cuando se intentó simular las curvas de germinación de las semillas que durante la inducción en dormición secundaria se incubaron a 10 °C (Figuras 2.2 y 2.5; Cuadros 2.2 y 2.3), sino que también, la inducción en dormición secundaria a 10 °C fue revertida si el almacenamiento a esta temperatura se prolongaba después de obtener un suficientemente "alto" nivel de dormición (Fig. 2.3 a). En conjunto, estos resultados sugieren que la fuerza relativa de cada proceso (es decir, salida de la dormición primaria o inducción en dormición secundaria) dentro de este rango de temperaturas depende, no solamente de la temperatura de almacenamiento, sino también del nivel de dormición de las semillas. De esta manera, cuando se evaluaron las semillas que habían empezado a entrar en dormición secundaria a 10 °C, esta temperatura no sólo impulsó la germinación, sino que también tuvo un efecto sobre la salida de la dormición que debió ser considerado a través de las correcciones en  $T_{l(50)}$ . Del mismo modo, cuando las semillas con un nivel de dormición bajo se almacenaron a 10 °C, la inducción de la dormición prevaleció hasta que las semillas tuvieron "suficiente" dormición y, a partir de ahí, la misma temperatura promovió la salida de la dormición (Fig. 2.3 a). La idea de los procesos de inducción y salida de la dormición que tienen lugar simultáneamente a ciertas temperaturas fue propuesta por primera vez por Totterdell y Roberts (1979). Más recientemente, Batlla et al. (2009) y Batlla y Benech-Arnold (2015) sugirieron que una competencia entre distintas fuerzas (es decir, salida de la dormición, inducción en

dormición, germinación) podría estar operando a ciertas temperaturas. Sin embargo, la posibilidad de que la fortaleza relativa de cada una de estas fuerzas que compiten dependa del nivel de dormición de la población de semillas, no ha sido sugerida sino hasta este trabajo.

Curiosamente, nuestros resultados también muestran que la tasa de inducción en dormición secundaria se ve afectada por la temperatura de estratificación previamente experimentada por las semillas durante la salida de la dormición primaria, incluso cuando las semillas habían acumulado la misma cantidad de  $S_{tt}$  (en unidades de °Cd) y, en consecuencia, había alcanzado similares  $T_{l(50)}$  (Fig. 2.5; Cuadro 2.3). Estas diferencias en la tasa de inducción en dormición secundaria pueden ser explicadas por los diferentes valores de  $\sigma_{TI}$  observados para las semillas estratificadas a diferentes temperaturas antes de la exposición a temperaturas que inducen dormición; debe tenerse en cuenta que el modelo supone que este  $\sigma_{TI}$  inicial no cambia durante la inducción en dormición. Los diferentes valores de  $\sigma_{TI}$  (es decir, diferente distribución de la  $T_{l(50)}$  dentro de la población de semillas) restringen la fracción de semillas capaces de germinar a medida que la distribución de  $T_{l(50)}$  se desplaza hacia valores más altos durante la inducción en dormición (Fig. 2.6). En condiciones de campo, esto implica que la tasa de inducción en dormición secundaria debido al aumento de la temperatura durante la primavera – principios de verano, dependerá de las temperaturas invernales que estimularon la salida de la dormición primaria; cuanto menor haya sido la temperatura de invierno más alta puede esperarse que sea la tasa de inducción en un cierto escenario térmico de primavera.

En el presente capítulo no sólo se desarrolló un modelo capaz de predecir cómo el rango térmico permisivo para la germinación de las semillas se estrecha durante la inducción en dormición secundaria en función del tiempo y la temperatura, sino que también mostramos un enfoque para comprender la complejidad de la regulación del nivel de dormición de las semillas por la temperatura. Los resultados obtenidos mostraron que la tasa de inducción en dormición no solo depende de la temperatura imperante, sino también de la temperatura experimentada previamente por las semillas durante la salida de la dormición primaria y el nivel de dormición de la población de semillas.



## **CAPÍTULO 3**

**EL PAPEL DE LA DISPONIBILIDAD HÍDRICA COMO  
MODULADOR DE LA DINÁMICA DE LA SALIDA DE LA  
DORMICIÓN PRIMARIA E INDUCCIÓN EN  
DORMICIÓN SECUNDARIA EN SEMILLAS DE  
*Polygonum aviculare* L.**



## CAPÍTULO 3

### 3. EL PAPEL DE LA DISPONIBILIDAD HÍDRICA COMO MODULADOR DE LA DINÁMICA DE LA SALIDA DE LA DORMICIÓN PRIMARIA E INDUCCIÓN EN DORMICIÓN SECUNDARIA EN SEMILLAS DE *Polygonum aviculare* L.

#### 3.1 Introducción

La dormición en semillas de muchas especies de malezas determina la existencia de bancos de semillas que tienden a perpetuarse en el suelo. El número de plántulas establecidas y el tiempo de emergencia de las malezas está fuertemente relacionado con la dinámica de la salida de la dormición de la población de semillas (Benech-Arnold et al., 2000). En condiciones naturales, las semillas se encuentran expuestas a la influencia de varios factores ambientales simultáneamente (Bewley y Black, 1994). La mayoría de las especies de semillas se ven afectadas por más de un factor; sin embargo, existe suficiente evidencia que demuestra que la temperatura del suelo es uno de los principales factores que regula los cambios estacionales en el nivel de dormición de los bancos de semillas en ambientes templados (Nonogaki et al., 2010). Por ejemplo, para especies anuales de primavera-verano, la salida de la dormición ocurre cuando las semillas embebidas perciben las bajas temperaturas durante el invierno (estratificación), mientras que el nivel de dormición se incrementa por las altas temperaturas experimentadas durante el verano (Bouwmeester y Karssen, 1992, 1993; ver Capítulo 2). Las especies anuales de invierno presentan un patrón de dormición inverso, donde las altas temperaturas durante el verano disminuyen el nivel de dormición y las bajas temperaturas durante el invierno lo incrementan induciendo a las semillas en dormición secundaria (Baskin y Baskin, 1977, 1983; Karssen, 1982; Probert, 1992).

El nivel de dormición de las semillas establece la amplitud del rango de condiciones ambientales dentro del cual la germinación puede ocurrir (Vegis, 1964). Este rango está compuesto por dos temperaturas límites umbrales: la temperatura del límite inferior ( $T_l$ ) y la temperatura del límite superior ( $T_h$ ) (Washitani, 1987; Kruk y Benech-Arnold, 1998; Batlla y Benech-Arnold, 2003; Batlla y Benech-Arnold, 2015). En especies primavero-estivales, los cambios en el nivel de dormición se deben a que aumenta o disminuye la  $T_l$ , mientras que, en especies de invierno se deben a fluctuaciones en la  $T_h$  (Benech-Arnold et al., 2000). Para especies anuales de primavera-verano, como *Polygonum aviculare*, la germinación de una fracción de la población del banco de semillas se produce cuando el aumento de la temperatura del suelo (durante la primavera) excede la  $T_l$  para dicha fracción (Vleeshouwers et al., 1995; Vleeshouwers y Bouwmeester, 2001; Kruk y Benech-Arnold, 1998; Batlla y Benech-Arnold, 2003). Más allá del efecto regulador de la temperatura sobre los cambios en el nivel de dormición, algunos estudios sugieren que el régimen hídrico del suelo podría desempeñar un papel importante junto a la temperatura en la regulación de la dormición de las semillas en condiciones de campo (Karssen, 1980; Allen et al., 2000; Allen et al., 2007).

El nivel de dormición de la población de semillas puede ser afectado por el contenido hídrico del suelo a través de su efecto sobre el nivel de humedad de las semillas (Baskin y Baskin, 1998). Esta condición afecta fuertemente a las especies que crecen en regiones templadas, en particular las adaptadas a la emergencia en la primavera, debido a los requerimientos de bajas temperaturas en condiciones de humedad para estimular la salida de la dormición de las semillas (Baskin y Baskin, 1985, 1998; Probert, 1992). No

obstante, los requerimientos de humedad en las semillas varían con las especies. Por ejemplo, Wang et al. (2009) observaron que la salida de la dormición por la exposición a bajas temperaturas en *Vitis vinicola* se mantuvo sin cambios por debajo del 20% de contenido de humedad en la semilla; sin embargo, por encima del 20% la tasa de salida de la dormición aumentó hasta maximizarse en 40%, determinando un umbral de mínimo y óptimo de requerimiento de contenido hídrico en las semillas. Por otra parte, Bair et al. (2006) cuantificaron el efecto del contenido de humedad del suelo sobre la salida de la dormición en semillas de *Bromus tectorum*, encontrando que incluir este factor en un modelo hidrotermal permitió mejorar la predicción de la tasa salida de la dormición. Más allá de estos pocos ejemplos, y hasta lo mejor de mi conocimiento, no hay otros estudios que hayan intentado caracterizar y mucho menos cuantificar el efecto del contenido hídrico en el suelo sobre los cambios en el nivel de dormición de las poblaciones de semillas (Batlla y Benech-Arnold, 2010).

En el presente Capítulo se presentan resultados de experimentos llevados a cabo con el fin de determinar en forma cuantitativa el efecto de la disponibilidad hídrica como modulador de la dinámica de la salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria en semillas de *Polygonum aviculare*. Sobre esa base, se propone el desarrollo de un modelo para describir y cuantificar la salida de la dormición primaria y la inducción en dormición secundaria en función del contenido hídrico de las semillas y la temperatura para semillas enterradas en el suelo.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Recolección y preparación del material vegetal**

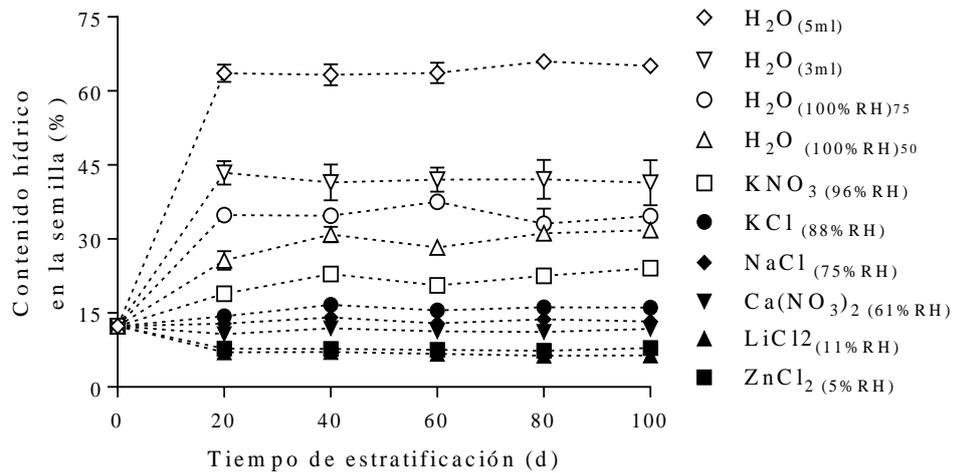
La metodología empleada fue descrita en el Capítulo 2 (ver “*Materiales y métodos*” en la sección de “*Recolección y preparación del material vegetal*”).

### **3.2.2 Condiciones experimentales durante la salida de la dormición primaria**

Al inicio del experimento, cuatro réplicas con 40 semillas cada una se expusieron a una prueba de germinación (ver “*Test de germinación*”) para cuantificar el nivel de dormición inicial de la población (se observó una germinación <2%). Se evaluó el contenido de humedad de las semillas después de realizada la cosecha para determinar el contenido de humedad inicial de la población (12%). Con el objetivo de producir un rango de contenido hídrico en las semillas se generaron diferentes condiciones de Humedad Relativa (HR) mediante el uso de soluciones salinas saturadas, las cuales producen los siguientes valores nominales de HR en la atmósfera con la que entran en contacto en un recipiente con aire confinado: 5%<sup>HR</sup> (ZnCl<sub>2</sub>), 15%<sup>HR</sup> (LiCl), 61%<sup>HR</sup> (Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 75%<sup>HR</sup> (NaCl), 88%<sup>HR</sup> (KCl), 96%<sup>HR</sup> (KNO<sub>3</sub>), 100%<sup>HR</sup> (H<sub>2</sub>O) y semillas embebidas (3 y 5 ml de agua destilada). Las humedades relativas generadas por estas sales son conocidas por ser bastante estables para el rango de temperaturas utilizadas en nuestro experimento (Merritt et al., 2003; Gundel et al., 2009) (Fig. 3.1).

Una vez establecidas las soluciones salinas, se utilizaron tres cajas de plástico herméticas (13 cm ancho x 13 cm alto x 13 cm largo; cada caja corresponde a una repetición, n=3) para ajustar los tratamientos a cada HR alcanzada. Cada caja utilizada tenía un volumen de 1000 ml y la tercera parte de este volumen se llenó con las soluciones de sal saturada contenida en cuatro frascos de vidrio abiertos en la parte superior. Aproximadamente 120 semillas se colocaron en pequeñas cestas de plástico (malla de plástico de 1 mm x 1 mm) que permiten el intercambio de aire entre las semillas y la atmósfera generada. Las pequeñas cestas de plástico se colocaron sobre los frascos de

vidrio (cuatro por caja), se utilizó una malla de plástico entre los frascos de vidrio y las cestas para evitar el contacto de las semillas con la solución líquida. Luego, las semillas fueron dispuestas en una cámara a temperatura constante de 5 °C (condición térmica de estratificación para la salida de la dormición primaria) bajo las diferentes condiciones de Humedad Relativa (HR) durante 100 días. La temperatura dentro de la cámara se registró cada hora con un sensor de temperatura (RC – 30B, *Temperature Data – Logger, Schwyz*) durante todo el experimento.



**Figura 3.1** Evolución del contenido hídrico en las semillas (*CHS*%) de *P. aviculare* durante el tiempo de estratificación (5 °C) bajo diferentes condiciones de HR. Los símbolos corresponden a los valores medios de *CHS* y las barras corresponden al error estándar ( $\pm$ SE). Cuando el SE no se ve es porque el error es menor que el tamaño del símbolo.

Las semillas fueron extraídas de las cajas cada 20 días (20, 40, 60, 80 y 100 días) y fueron expuestas al test de germinación (ver “*Test de germinación*” en este Capítulo 3.2.4). En cada extracción se determinó el contenido hídrico que presentaban las semillas. Se utilizó la siguiente metodología para medir el contenido hídrico en las semillas:

Las semillas se colocaron en un desecador de vidrio (campana libre de humedad, con silica gel) para evitar cambios en el contenido de humedad de las semillas por la exposición a la atmósfera del lugar donde se llevaron a cabo los experimentos). Se registró el peso fresco inicial de las semillas y luego peso seco inmediatamente después de secar a 130 °C durante 2 hs en una estufa de secado. El contenido de humedad en las semillas se estimó mediante la siguiente fórmula:

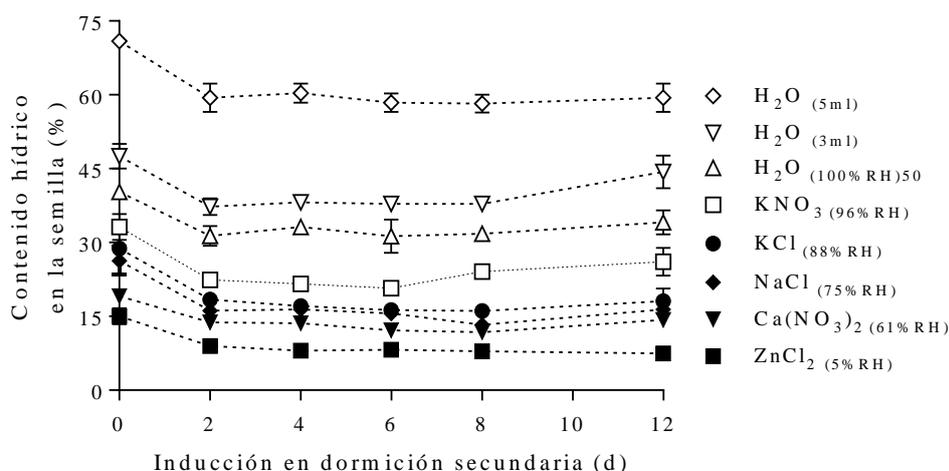
$$CHS(\%) = (W_w / W_s) \times 100 \quad \text{Ecuación (3.1)}$$

donde *CHS* (%) = Contenido hídrico en la semilla, *W<sub>w</sub>* = peso fresco de las semillas y *W<sub>s</sub>* = peso seco de las semillas.

### 3.2.3 Condiciones experimentales durante la entrada en dormición secundaria

Para inducir la entrada en dormición secundaria en semillas de *P. aviculare* se utilizaron semillas previamente estratificadas a 5 °C durante 100 días (*S<sub>tt</sub>* = 1200 °Cd). Según Batlla y Benech-Arnold (2003), este tiempo de estratificación determina que las semillas alcancen un bajo nivel de dormición (aprox. 70% de germinación, en condiciones sin restricción hídrica,  $\approx$  34% *CHS*). Luego de los 100 días de estratificación las semillas fueron colocadas en cada condición de HR (5%<sup>HR</sup> (ZnCl<sub>2</sub>), 15%<sup>HR</sup> (LiCl), 61%<sup>HR</sup> (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 75%<sup>HR</sup> (NaCl), 88%<sup>HR</sup> (KCl), 96%<sup>HR</sup> (KNO<sub>3</sub>), 100%<sup>HR</sup> (H<sub>2</sub>O) y semillas

embebidas en 3 y 5 ml de agua destilada durante 48 hs a 5 °C en oscuridad para permitir el equilibrio entre la HR del ambiente y el contenido hídrico generado en las semillas. El acondicionamiento se realizó en un cuarto oscuro bajo luz verde muy tenue. Luego, las semillas con diferente contenido hídrico fueron incubadas a 20 °C, una temperatura que induce a las semillas de *P. aviculare* rápidamente en dormición secundaria (Batlla y Benech-Arnold, 2003), por 0, 2, 4, 6, 8 y 12 días (Fig. 3.2). La temperatura dentro de la cámara a 20 °C se registró cada hora con un sensor de temperatura (RC – 30B, *Temperature Data – Logger, Schwyz*) durante todo el experimento. Las semillas extraídas a cada tiempo fueron expuestas al “*Test de germinación*” (sección siguiente) y el control del contenido hídrico en las semillas se llevó a cabo como fue explicado en la sección anterior.



**Figura 3.2** Evolución del contenido hídrico en las semillas (*CHS%*) de *P. aviculare* durante la inducción en dormición secundaria a 20 °C bajo diferentes condiciones de HR. Los símbolos corresponden a los valores medios de *CHS* y las barras corresponden al error estándar ( $\pm$ SE). Cuando el SE no se ve es porque el error es menor que el tamaño del símbolo.

### 3.2.4 *Test de germinación*

Las semillas fueron retiradas de las cajas herméticas de plástico bajo condiciones de luz verde muy tenue. En cada extracción, se colocaron tres réplicas de 40 semillas en placas de Petri con doble papel de filtro (Whatman N° 3) en 5 ml de agua destilada y se incubaron durante 24 hs a 15 °C (para permitir la imbibición completa de las semillas). Después de la imbibición, las semillas fueron expuestas a un pulso saturante de la luz roja durante 20 minutos (provista por placas de filtros de acetato rojos; La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina), y luego se incubaron a una temperatura constante de 15 °C en oscuridad. La temperatura en el interior de las cámaras de germinación se registró cada hora durante el periodo de incubación con un sensor de temperatura (RC – 30B, *Temperature Data – Logger, Schwyz*). Las semillas fueron expuestas a luz fluorescente blanca durante el conteo y las semillas germinadas fueron desechadas luego del conteo. El criterio para determinar semillas germinadas fue el crecimiento de la radícula mayor a 2 mm.

### 3.2.5 Cuantificación de los parámetros térmicos durante la salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria

Los datos de germinación obtenidos durante la salida de la dormición primaria (20, 40, 60, 80 y 100 días de estratificación a 5 °C) e inducción en dormición secundaria (0, 2, 4, 6, 8 y 12 días de almacenamiento en húmedo a 20 °C) para los distintos valores de *CHS* fueron analizados utilizando el modelo matemático desarrollado por Washitani (1987) y utilizado en el Capítulo 2. El modelo permite estimar los parámetros que determinan el rango de temperaturas permisivas para la germinación de la población de semillas, caracterizado por la temperatura media del límite inferior ( $T_{l(50)}$ ) (la temperatura por encima de la cual no se expresa la dormición) y su desvío estándar  $\sigma_{Tl(50)}$ , y la temperatura media del límite superior ( $T_{h(50)}$ ) (la temperatura por debajo de la cual no se expresa la dormición), y su desvío estándar  $\sigma_{Th(50)}$ . Por otro lado, el modelo de Washitani permite estimar los parámetros que caracterizan la respuesta de la germinación de la población de semillas a la temperatura (i.e. la temperatura base ( $T_b$ ), óptima ( $T_o$ ) y máxima ( $T_m$ ), el tiempo térmico medio para la germinación ( $\theta_{50}$ ) y su desvío). Para cuantificar el efecto de la disponibilidad hídrica y la temperatura de estratificación sobre el nivel de dormición de la población de semillas, los cambios en  $T_{l(50)}$  fueron graficados en función del número de unidades térmicas de estratificación ( $S_{tt}$ ) acumuladas por debajo de una temperatura umbral para que ocurra la salida de la dormición, de acuerdo con la siguiente ecuación (Batlla y Benech-Arnold, 2003):

$$S_{tt} = \text{Días} \cdot (T_c - T_s) \quad \text{Ecuación (3.2)}$$

donde  $T_c$  es la temperatura de salida de la dormición (17 °C, temperatura a, o por encima de la cual, la salida de la dormición no ocurre) y  $T_s$  es la temperatura media diaria de estratificación. Para cuantificar el efecto de la disponibilidad hídrica y las temperaturas de inducción en dormición secundaria sobre el nivel de dormición de la población de semillas, los cambios en  $T_{l(50)}$  se cuantificaron como una función de la acumulación de unidades de tiempo térmico de inducción en dormición secundaria ( $DI_{tt}$ ) de acuerdo con la siguiente ecuación (Capítulo 2):

$$DI_{tt} = \text{Días} \cdot (T_s - T_{uDI}) \quad \text{Ecuación (3.3)}$$

donde  $DI_{tt}$  es el tiempo térmico de inducción en dormición secundaria (°Cd),  $T_{uDI}$  es la temperatura umbral para la inducción en dormición secundaria (7,9 C, temperatura a la cual o debajo de la cual la inducción en dormición no se produce) y  $T_s$  es la temperatura media diaria de almacenamiento.

### 3.2.6 Evaluación del ajuste entre los valores observados y predichos

Los parámetros térmicos óptimos para el modelo de germinación se obtuvieron mediante un método de ajuste de curva no lineal utilizando un programa de optimización (Solver for Nonlinear Programming 0.9, *Sun Microsystem, Inc.*). El ajuste máximo entre los datos simulados y obtenidos experimentalmente se logró por una técnica iterativa utilizando un algoritmo DEPS *Evolutionary algorithm*. El criterio estadístico utilizado para determinar los parámetros térmicos óptimos, fue el de minimizar la raíz del cuadrado medio del error (del inglés, *Root Mean Squared Error-RMSE*) de la simulación. El valor de RMSE utilizado para la optimización fue el promedio del RMSE resultante del ajuste de ambas curvas del régimen de germinación de la prueba de germinación:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{obs,i} - X_{model,i})^2}{n}} \quad \text{Ecuación (3.4)}$$

donde,  $X_{obs}$  son los valores observados y  $X_{model}$  son los valores pronosticados en el tiempo  $i$ .

### 3.2.7 Desarrollo del modelo

Para describir la salida de la dormición primaria y la inducción en dormición secundaria en función de la temperatura y del contenido hídrico de las semillas de *P. aviculare*, se estableció una relación funcional entre la tasa de salida de la dormición o entrada en dormición (medida como cambios en  $T_{l(50)}$  por unidad de tiempo térmico de estratificación ( $\Delta T_{l(50)}/\Delta S_{tt}$ ) o como cambios en  $T_{l(50)}$  por unidad de tiempo térmico de inducción en dormición secundaria ( $\Delta T_{l(50)}/\Delta DI_{tt}$ ), respectivamente) y el contenido hídrico que tuvieron las semillas durante el proceso de estratificación e inducción en dormición secundaria (7% a 64% *CHS*) a diferentes temperaturas. Como se describió anteriormente, la salida de la dormición primaria y la inducción en dormición secundaria en semillas de *P. aviculare* se cuantificó a través de cambios en  $T_{l(50)}$  y  $\sigma_{Tl(50)}$ , por lo que estos parámetros térmicos se utilizaron como un indicador del nivel de dormición de la población de semillas (Batlla y Benech-Arnold, 2003).

Los pasos de desarrollo del modelo se resumen a continuación:

- (1) Determinar los parámetros térmicos de la población de semillas que logren maximizar el ajuste entre las curvas de germinación obtenidas experimentalmente y las simuladas por el modelo de Washitani para cada tiempo de extracción durante la salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria para las diferentes condiciones de contenido hídrico de las semillas.
- (2) Caracterizar los cambios en  $T_{l(50)}$  y  $\sigma_{Tl(50)}$  de la población de semillas en función de las unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) acumuladas para la salida y la inducción en dormición secundaria para las diferentes condiciones de contenido hídrico, y derivar ecuaciones que permitan relacionar los cambios en  $T_{l(50)}$  en función de la disponibilidad hídrica de las semillas.
- (3) Sobre la base de la caracterización realizada en (2), relacionar la tasa de cambio de la  $T_{l(50)}$  por unidad de  $S_{tt}$  o  $DI_{tt}$  con los diferentes contenidos hídricos en la semilla (*CHS*), determinando valores umbrales y óptimos de *CHS* para que ocurra la salida y/o la inducción en dormición secundaria.
- (4) Validar los modelos desarrollados en (3) utilizando un conjunto de datos experimentales independientes obtenidos a campo.

### 3.2.8 Evaluación del modelo

El comportamiento del modelo se evaluó contra un conjunto de datos independientes provenientes de un experimento realizado en condiciones de campo. Las semillas de *P. aviculare* recolectadas en la localidad de Balcarce (al sur de la Provincia de Buenos Aires) fueron puestas en bolsitas de malla de nylon (aprox. 300 semillas), luego fueron enterradas a 5 cm de profundidad en el suelo (4 réplicas x 8 exhumaciones) en el campo Experimental de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (Lat. 34° 25' S, Long. 58° 25' W), Argentina, a finales de marzo del 2015 (momento

de la dispersión natural). Las semillas permanecieron bajo las condiciones ambientales naturales que prevalecieron durante todo el experimento (otoño, invierno y primavera). Cada 25 días, las bolsitas que contenían las semillas fueron exhumadas (4 réplicas por exhumación). Un grupo de semillas fueron sometidas al test de germinación (ver “*Test de germinación*”) y se les determinó el contenido de humedad al momento de la exhumación. Otro grupo de semillas fueron expuestas a 10 min de luz natural y se colocaron en cilindros con tierra (1 cilindro por réplica,  $n=4$ ) y se contó el número de plántulas emergidas durante un periodo de 30 días; durante este periodo el sustrato se mantuvo húmedo mediante riegos regulares de modo de permitir la germinación. La temperatura del suelo y el contenido hídrico se registraron por medio de sensores de temperatura y humedad (*Temperature – Logger*: METEO4, SCH-10, Cavadevices.com. Argentina).

### 3.3 Resultados

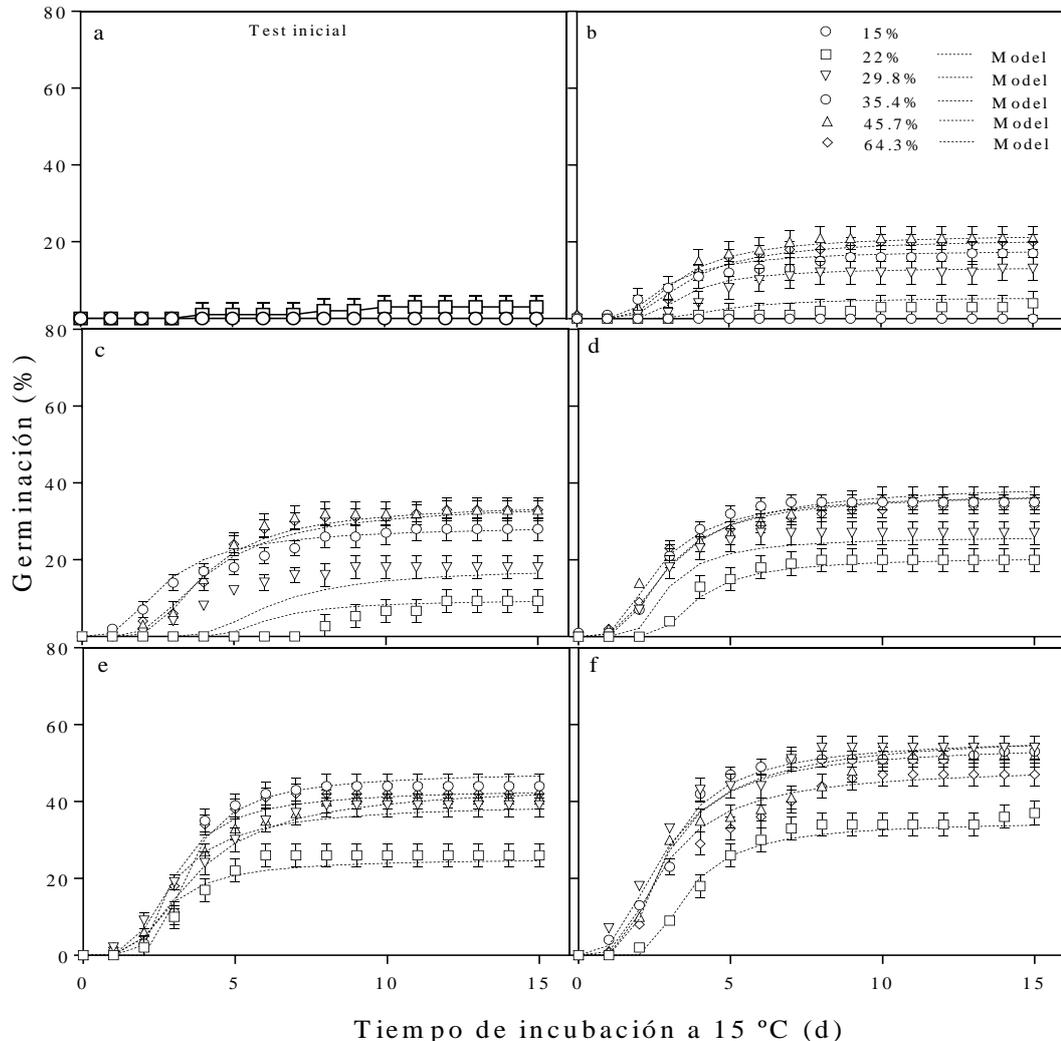
#### 3.3.1 Dinámica de germinación durante la salida de la dormición primaria de semillas estratificadas con diferentes contenidos hídricos

Al inicio de los experimentos las semillas de *P. aviculare* contaban con un contenido hídrico de 12% (Fig. 3.1). La población de semillas presentaba un alto nivel de dormición al inicio del experimento, ya que la germinación no excedió el 2% (Fig. 3.3 a). La exposición de las semillas a las diferentes condiciones de HR (5 – 100 HR%) y semillas embebidas en 3 y 5ml, permitió obtener variabilidad en términos de contenido hídrico de la semilla (i.e. 7 a 64% *CHS*) (Fig. 3.1; Fig. 3.2). Esto permitió que las semillas exploraran un amplio rango de contenido hídrico durante la exposición a condiciones que permiten la salida de la dormición primaria y la inducción en dormición secundaria (Fig. 3.3 y 3.6).

El *CHS* durante el proceso de estratificación afectó la tasa de salida de la dormición primaria, y por lo tanto, el nivel de dormición de las semillas de *P. aviculare* al cabo de un tiempo de estratificación (Fig. 3.3). El rango de *CHS* estudiado permitió identificar un valor mínimo (umbral) del 15% de *CHS* a partir del cual el proceso de estratificación tiene lugar. Semillas expuestas a valores de *CHS* por debajo de este umbral (<15%) permanecieron dormidas, sin observarse modificaciones en el nivel de dormición. En cambio, valores de *CHS* por encima de este umbral (>15%) promovieron el efecto de la temperatura de estratificación sobre la salida de la dormición (Fig. 3.4 a). A su vez, valores de *CHS* >15% modularon la tasa de salida de la dormición, a medida que aumentaba el contenido hídrico en las semillas hasta llegar a un valor óptimo (30% *CHS*), la velocidad de salida de la dormición (medida como cambios en la  $T_{l(50)}$  por unidad de tiempo térmico de estratificación) aumentó. Por encima de 30% *CHS* no hubo modificaciones en la tasa de salida de la dormición. Por ejemplo, durante la primera extracción a los 20 días, se observó un incremento progresivo en la germinación a medida que los valores de *CHS* aumentaban hasta un máximo (i.e. 15 – 30% *CHS*), y que por encima de este valor no hubo aumentos en los porcentajes de germinación obtenidos (Fig. 3.3 y 3.4a).

Este mismo patrón fue observado para el resto de las extracciones (40, 60, 80 y 100 días) (Fig. 3.4 a), donde semillas con *CHS* por debajo del 30% presentaron porcentajes de germinación menores para una misma condición de tiempo (días) y temperatura de estratificación. Estos resultados indican que el contenido hídrico presente en la semilla regula la tasa con la cual las semillas salen de la dormición a una misma temperatura de estratificación, a partir de un valor umbral. Sin embargo, cuando las

semillas son expuestas a valores de *CHS* por encima de 30% los porcentajes de germinación son relativamente similares, indicando que existe un valor de *CHS* a partir del cual la tasa de salida de la dormición es máxima (Fig. 3.4 a). Estos resultados sugieren que las semillas de *P. aviculare* necesitan un mínimo requerimiento de *CHS* para que la temperatura empiece a tener un efecto sobre la salida de la dormición primaria, y que por encima de este valor umbral, la tasa de salida de la dormición es dependiente del *CHS*.

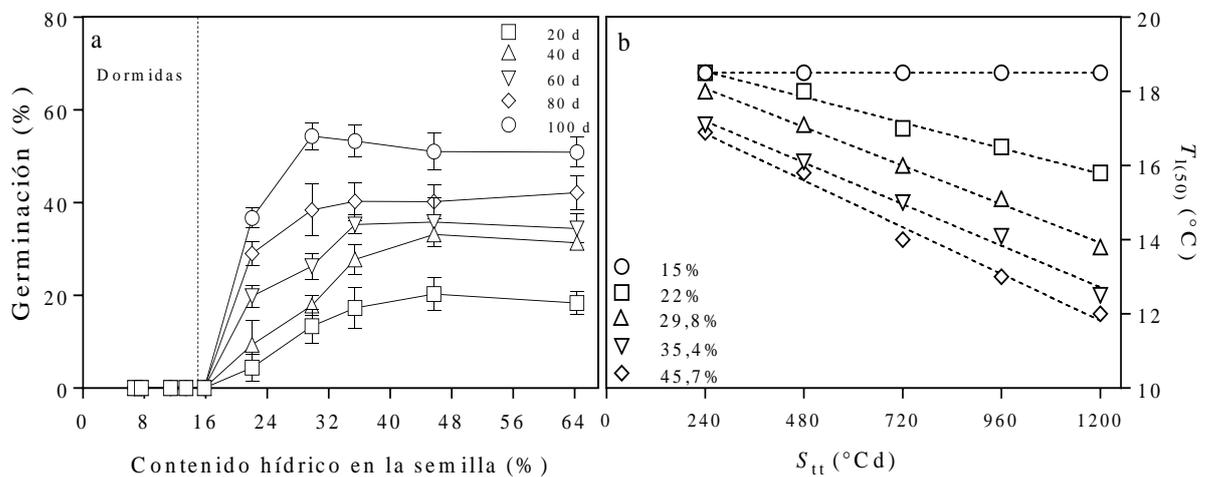


**Figura 3.3** Curvas de germinación obtenidas a temperaturas de incubación de 15 °C para semillas de *P. aviculare* con distinto contenido de humedad estratificadas a 5 °C que habían acumulado diferentes cantidades de tiempo térmico de estratificación: 0 °Cd (a), 240 °Cd (b), 480 °Cd (c), 720 °Cd (d), 960 °Cd (e) y 1200 °Cd (f). Los símbolos vacíos representan los porcentajes de germinación obtenidos a 15 °C y las líneas continuas de colores representan las curvas de germinación simuladas usando las ecuaciones descritas en el Capítulo 2 para el modelo de Washitani. Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### 3.3.2 Cuantificación de los parámetros térmicos que caracterizan los cambios en el nivel de dormición durante la salida de la dormición primaria

Se estimaron los parámetros térmicos de la población de semillas que maximizaron el ajuste entre las curvas de germinación simuladas y las curvas de germinación obtenidas experimentalmente, para cada tiempo al cual se extrajeron las semillas estratificadas a 5 °C (20, 40, 60, 80 y 100 días) bajo diferentes condiciones de

contenido hídrico (7 – 64% *CHS*) (Fig. 3.3). Cambios en la  $T_{l(50)}$  fueron observados para valores de *CHS* por encima del 15% y hasta un 30%; por debajo de 15% *CHS* la  $T_{l(50)}$  de las semillas permaneció sin modificación alguna (Fig. 3.4a). Por encima de 15% *CHS* se observó una progresiva disminución en la  $T_{l(50)}$  a partir de los primeros 20 días como consecuencia del proceso de estratificación; la tasa de cambio fue dependiente del contenido hídrico con el cual fueron estratificadas las semillas: contenidos hídricos más bajos en las semillas resultaron en una menor tasa de disminución de  $T_{l(50)}$  en comparación con contenidos hídricos mayores (Fig. 3.4 b). Por ejemplo, las semillas que permanecieron expuestas a  $CHS = 22\%$  presentaron leves cambios en la  $T_{l(50)}$ , mientras que, semillas expuestas a valores de  $CHS = 30\%$ , presentaron mayores cambios en la  $T_{l(50)}$ . Estos resultados indican que los cambios en el nivel de dormición como resultado de la exposición a temperaturas de estratificación, son modulados por la disponibilidad hídrica que presentan las semillas entre un 15% y un 30% de *CHS*. La disminución de la  $T_{l(50)}$  en función del tiempo para semillas estratificadas a 5 °C a diferentes contenidos hídricos, fue adecuadamente descrita mediante el ajuste de funciones lineales (Fig 3.4 b).



**Figura 3.4 (a)** Porcentajes finales de germinación en función de los diferentes contenidos hídricos para semillas de *P. aviculare* estratificadas a 5 °C durante 100 días. A partir del 15% de *CHS* se promueve el efecto de la estratificación sobre la salida de la dormición primaria, semillas con *CHS* por debajo de 15% se mantienen dormidas (línea vertical punteada marca el umbral). Los símbolos representan el porcentaje de germinación obtenido para cada condición de *CHS*. Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo. **(b)** Estimación de los valores de la temperatura del límite inferior ( $T_{l(50)}$ ) para semillas de *P. aviculare* incubadas a 15 °C (derivado de las curvas simuladas mostradas en la Fig. 3.3), en función de los días de estratificación y los diferentes *CHS*. Valores estimados para  $T_{l(50)}$  a partir del *CHS* de 15% se obtuvieron en función de la acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) de acuerdo con la ecuación (3.2). Las líneas de puntos se ajustaron mediante ecuaciones lineales para cada contenido hídrico, con valores de  $R^2$  de 0,98 (22% *CHS*), 0,99 (29,8% *CHS*), 0,98 (35,4% *CHS*), y 0,97 (45,7% *CHS*), respectivamente ( $P$ -value = < 0.0001, test de pendientes, para verificar que las pendientes son significativas diferentes).

### 3.3.3 Modelo de salida de la dormición primaria en función de la disponibilidad hídrica de las semillas

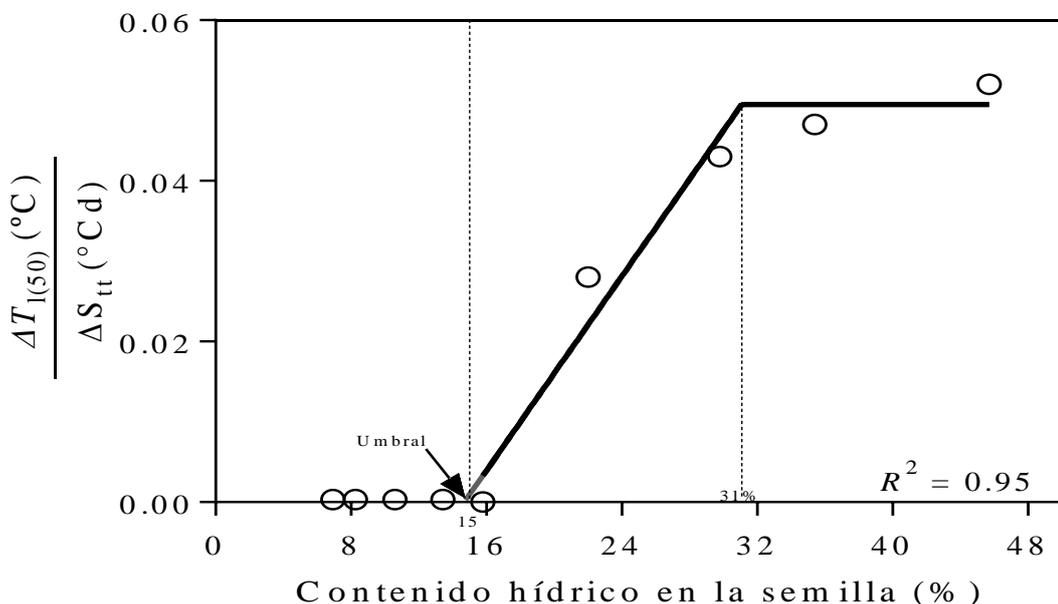
Las relaciones establecidas entre  $T_{l(50)}$  y  $S_{tt}$  para semillas estratificadas con diferente *CHS* mostraron pendientes (negativas) diferentes según el *CHS* (Fig. 3.4 b). Así, para valores de *CHS* iguales o menores a 15%, la pendiente no fue significativamente diferente de 0, denotando que con *CHS* iguales o inferiores a 15% no se producen cambios

en  $T_{l(50)}$  con la acumulación de  $S_{tt}$  o, dicho de otra manera, el nivel de dormición no cambia aun cuando se acumule  $S_{tt}$ . Con un *CHS* de 22% la pendiente fue significativamente diferente de 0 aunque menor que la determinada para un *CHS* de 29,8% y superiores (Fig. 3.4 b); de hecho, no hubo diferencia significativa entre las pendientes de las relaciones para *CHS* de 29,8%, 35,4% y 45,7% (Test de pendientes =  $<0.0001$ ; Cuadro 3.1), denotando que semillas con *CHS* iguales o superiores a 29,8% *CHS* alcanzan una tasa máxima de disminución  $T_{l(50)}$  (máxima tasa de salida de la dormición) en función de  $S_{tt}$ .

**Cuadro 3.1** Valores de pendiente y ordenada al origen de las ecuaciones lineales de  $T_{l(50)}$  en función del tiempo de estratificación ( $S_{tt}$ ) para distintos contenidos hídricos en las semillas (*CHS*). Las ecuaciones lineales fueron desarrolladas de acuerdo a la función lineal:  $Y = a \cdot X + b$ ; donde  $a$  es la pendiente de la función,  $X$  es el tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y  $b$  es ordenada al origen.  $R^2$  es el coeficiente de determinación del ajuste del modelo de regresión lineal.

<i>CHS</i> (%)	Pendiente de la función*	Ordenada al origen de la función*	$R^2$
$\leq 15$	0	-	-
22	0,0028 (a)	18,5 (a)	0,98
29,8	0,0043 (b)	18,5 (a)	0,99
35,4	0,0046 (b)	18,5 (a)	0,98
45,7	0,0052 (bc)	18,5 (a)	0,97

\*Test de pendientes ( $P$  value =  $<0.0001$ ), valores con una letra común no son significativamente diferentes.



**Figura 3.5** Modelo propuesto en base a la relación entre los cambios en  $T_{l(50)}$  de la población de semillas y las unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) en función del *CHS* (%) en semillas de *P. aviculare*. El modelo bi-lineal representa la tasa de salida de la dormición (disminución de la  $T_{l(50)}$  por unidad de tiempo térmico de estratificación acumulado ( $S_{tt} = ^\circ\text{Cd}$ )) en función del contenido hídrico en la semilla. La línea de puntos vertical representa el valor umbral de contenido hídrico de las semillas por encima del cual la estratificación promueve la salida de la dormición primaria, el modelo toma como base un contenido umbral de contenido hídrico de 15% de humedad en la semilla para que el proceso de estratificación tenga lugar. La segunda línea vertical de puntos tenues representa el valor óptimo de *CHS* para la salida de la dormición (31%).

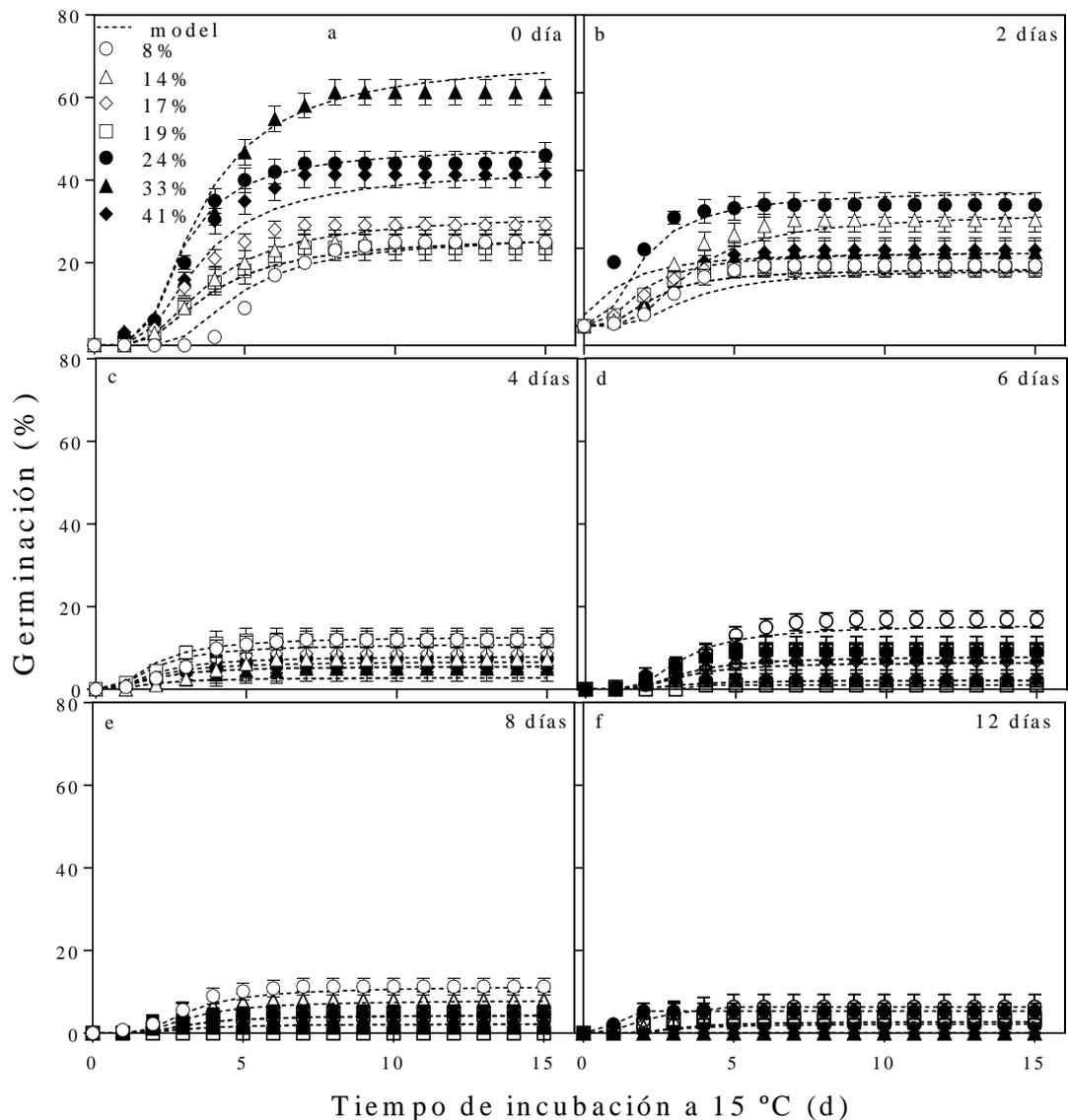
Para independizar el efecto del *CHS* del de la temperatura de estratificación, se construyó una variable que considera los cambios en la dormición de las semillas en función del *CHS* como la tasa de cambio de  $T_{l(50)}$  por unidad de tiempo térmico de estratificación  $S_{tt}$  ( $\Delta T_{l(50)} / \Delta S_{tt}$ ), que es el valor de las pendientes de las relaciones lineales graficadas en la figura (3.4 b) y que se muestran en la Cuadro (3.1). Graficando el valor de esta variable en función de *CHS*, se construyó la relación que se muestra en la figura (3.5). En esa figura se muestra que: i) la tasa de salida de la dormición por unidad de tiempo térmico de estratificación es 0 hasta que se alcanza un valor umbral de *CHS* de 15%; ii) que con *CHS* entre 15% y 31% la tasa de salida de la dormición por unidad de tiempo térmico de estratificación aumenta linealmente hasta alcanzar un máximo con *CHS* igual a 31%; iii) que con *CHS* superiores a 31% la tasa de salida de la dormición por unidad de tiempo térmico de estratificación es máxima. La relación que se muestra en la figura (3.5) constituye un modelo predictivo de la tasa de salida de la dormición en semillas de *P. aviculare* (medida como cambios en  $T_{l(50)}$ ) en función de la temperatura de estratificación y del contenido hídrico de las semillas durante el proceso de estratificación

### 3.3.4 Germinación de semillas que tuvieron diferente contenido hídrico durante la entrada en dormición secundaria

La dinámica de germinación para las semillas expuestas a las diferentes condiciones de *CHS* durante la entrada en dormición secundaria a 20 °C durante 0, 2, 4, 6, 8 y 12 días, se muestran en la figura (3.6). El nivel de dormición de la población previo a la inducción en dormición secundaria fue registrado al iniciar el experimento, mostrando un nivel de dormición relativamente bajo (germinación observada = 68%, punto gris en el eje-y, en la figura 3.7 a). Al cabo del tratamiento de estratificación para aliviar la dormición primaria, el *CHS* era de 34%; como se describió en “*Materiales y Métodos*”, estas semillas fueron expuestas por dos días a atmósferas generadas por el contacto con diferentes soluciones salinas a 5°C, de manera de que las mismas tuvieran diferentes *CHS* en el rango entre 9% – 61% antes de ser almacenadas a 20 °C, una temperatura que las debería inducir en dormición secundaria según los resultados obtenidos en el Capítulo 2. Sin embargo, la sola modificación del *CHS* en las semillas hasta valores bien por debajo del que tenían al concluir el tratamiento de estratificación, y antes de exponer las semillas a 20 °C para inducir las en dormición secundaria, fue suficiente como para incrementarles el nivel de dormición en forma muy marcada (i.e. de una germinación de 68% al salir de la estratificación, pasaron a germinar menos del 30% como promedio de lo observado para el rango de *CHS* de entre 9% y 19% *CHS* (Fig. 3.6 a; 3.7 a, inset). Sin embargo, las semillas a las que el *CHS* se les redujo hasta 32%, no mostraron la misma reducción de la germinación ante el cambio del *CHS* (día 0, sin restricción hídrica) (Fig. 3.7 a). Estos resultados indican, por un lado, que el contenido hídrico modula de forma independiente los cambios en el nivel de dormición por debajo y por encima de 32% de *CHS*.

Una vez que las semillas fueron expuestas a 20 °C, se observaron cambios en los porcentajes de germinación en los primeros 2 días de inducción para semillas con contenidos hídricos entre 19% y 41%, mostrando una disminución en los porcentajes de germinación en más del 45% respecto a sus valores iniciales (día 0 de inducción) (Fig. 3.6 a, b). Por ejemplo, para semillas con *CHS* = 24% se observaron valores de germinación de 46% a 30% (un 16% menos); sin embargo, para semillas con *CHS* = 33% se observaron valores de germinación de 67% a 19,3% (48% menos) y para semillas con valores de *CHS* = 41% y 61% mostraron valores de germinación de 56% y 55% a 20 y 18%, respectivamente (37% menos). A los 4 días de inducción en dormición, las semillas

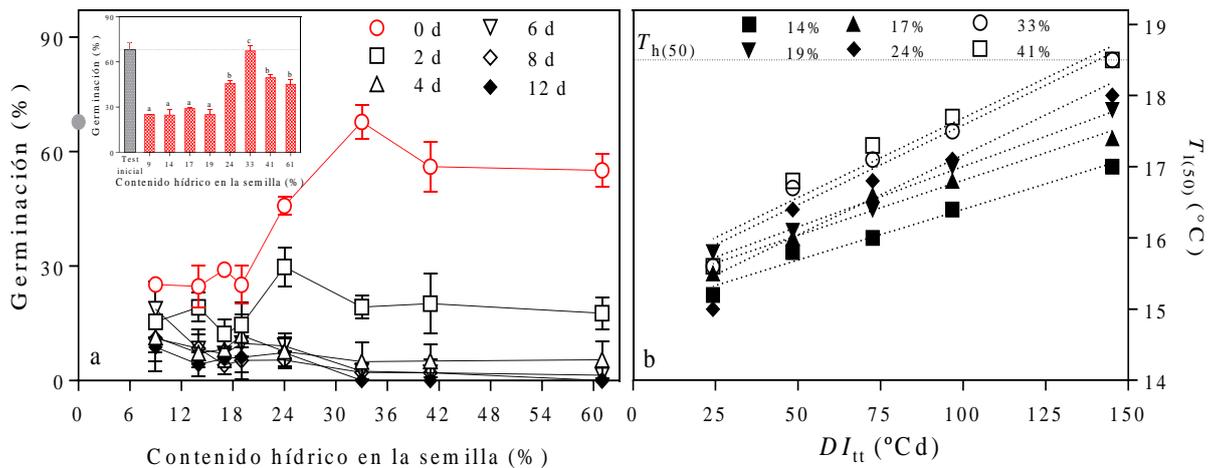
expuestas a cada una de las condiciones de *CHS* presentaron porcentajes muy bajos de germinación (entre 2 y 7%) (Fig. 3.7 a), evidenciando un alto nivel de dormición. A partir del día 4 en adelante, los valores de germinación alcanzados eran casi nulos. Estos resultados sugieren que la entrada en dormición secundaria no solamente es regulada por la temperatura, sino que también es modulada por el contenido hídrico de las semillas durante el proceso de entrada en dormición secundaria. Pero además, reducciones abruptas en el contenido hídrico de las semillas (p.ej. semillas embebidas cuyo *CHS* es llevado por debajo de 19%) modulan por si sola la entrada en dormición secundaria (Fig. 3.7 a).



**Figura 3.6** Curvas de germinación acumulada observada obtenida a temperatura constante de 15 °C para semillas de *P. aviculare* con distinto contenido de humedad durante la inducción en dormición secundaria a 20 °C. Cada panel corresponde al día de inducción en dormición secundaria: (a) día 0, (b) día 2, (c) día 4, (d) día 6, (e) día 8 y (f) día 12. Los símbolos (vacíos y llenos) representan los porcentajes de germinación obtenidos a 15 °C y las líneas continuas representan las curvas de germinación simuladas usando las ecuaciones descritas para el modelo de germinación desarrollado (Capítulo 2). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### 3.3.5 Cuantificación de los parámetros térmicos que caracterizan los cambios en el nivel de dormición durante la entrada en dormición secundaria

Se estimaron los parámetros térmicos de la población de semillas que maximizaron el ajuste entre las curvas de germinación simuladas y las curvas obtenidas experimentalmente para cada condición de *CHS* (9 – 61%) durante la inducción en dormición secundaria a 20 °C (0, 2, 4, 6, 8 y 12 días) (Fig. 3.6 y 3.7 b). Las variaciones en el nivel de dormición medidos a partir de los cambios en la  $T_{l(50)}$  obtenidos a partir de los ajustes para cada condición de *CHS* permitieron identificar 3 zonas de respuesta de la población de semillas al *CHS* durante la inducción en dormición secundaria. (1) Las semillas con valores de *CHS* <15% entraron en dormición secundaria con una tasa máxima incluso antes de ser expuestas a 20°C. (2) Por encima del 15% y hasta aproximadamente 32%, la inducción en dormición secundaria tuvo lugar a una tasa diferente: cuanto mayor fue el *CHS*, mayor fue la tasa a la que fueron inducidas en dormición secundaria (incremento gradual de la pendiente con la que  $T_{l(50)}$  aumenta en función de  $DI_{tt}$ , a partir del 15% de *CHS*). (3) Por último, una zona donde la tasa de inducción en dormición secundaria es máxima en el rango de *CHS* de 31 a 41% (i.e. rápido incremento en la  $T_{l(50)}$  en función de  $DI_{tt}$ . (Fig. 3.7 b). Estos resultados muestran que la tasa con la cual las semillas son inducidas en dormición secundaria estaría siendo regulada, por un lado, por el *CHS* en el rango de 9 a 15%, y por otro lado, por la temperatura modulada por el contenido hídrico de las semillas en el rango de 15 a 41%.



**Figura 3.7 (a)** Porcentajes de germinación obtenidos en función de los diferentes contenidos hídricos en semillas de *P. aviculare* inducidas en dormición secundaria a 20 °C durante 12 días. Los símbolos y las líneas continuas representan los días durante la inducción en dormición secundaria. La figura pequeña superior izquierda es una ampliación del día 0 antes de inducir las semillas en dormición secundaria. La barra vertical gris indica el porcentaje de germinación obtenido para una población con poca dormición ( $\approx 1200$  °Cd de  $S_{tt}$  sin restricción hídrica) (Germinación = 68%, punto gris en el eje de abscisas y), las barras en rojo indican los porcentajes de germinación obtenidos en el día 0 debido a los diferentes *CHS* antes de ser inducidas en dormición secundaria a 20 °C. Las barras verticales en ambas figuras indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo. **(b)** Cambios en la  $T_{l(50)}$  en función de los contenidos hídricos de las semillas durante el tiempo de inducción en dormición secundaria a 20 °C. Las líneas discontinuas se ajustaron mediante ecuaciones lineales para cada contenido hídrico, con valores de  $R^2$  de 0,95 (14% *CHS*), 0,96 (17% *CHS*), 0,96 (19% *CHS*), 0,90 (24%), 0,87 (33% *CHS*) y 0,83 (41% *CHS*), respectivamente ( $P$ -value = < 0.0001, test de pendientes, para verificar que las pendientes son significativas diferentes).

### 3.3.6 Modelo de entrada en dormición secundaria en función de la disponibilidad hídrica en las semillas

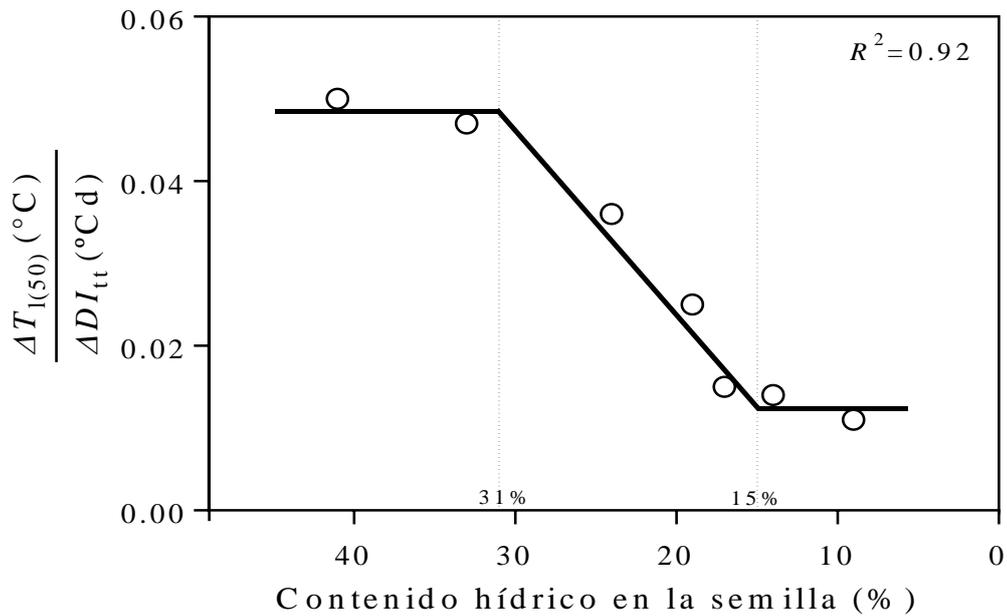
Las relaciones establecidas entre  $T_{l(50)}$  y  $DI_{tt}$  para semillas inducidas en dormición secundaria con diferente  $CHS$  mostraron pendientes (positivas) diferentes según el  $CHS$  (Fig. 3.7 b). Así, para valores de  $CHS$  por encima del 9% y menores o iguales al 15%, la pendiente cambia muy poco, denotando que con  $CHS$  iguales o inferiores a 15% los cambios que se producen en  $T_{l(50)}$  con la acumulación de  $DI_{tt}$  son mínimos. En cambio, con  $CHS$  de 17, 19 y 24% las pendientes fueron significativamente diferentes de 15%  $CHS$  (Cuadro 3.2, letras diferentes), aunque menor que la pendiente determinada para  $CHS$  de 33% y superiores (Fig. 3.7 b). En efecto, no hubo diferencia significativa entre las pendientes de las relaciones para  $CHS$  de 33% y 41%, (Test de pendientes =  $<0.0001$ ; Cuadro 3.2) indicando que semillas con  $CHS$  iguales o superiores a 33%  $CHS$  alcanzan una tasa máxima de incremento de  $T_{l(50)}$  (máxima tasa de inducción en dormición secundaria) en función de  $DI_{tt}$ .

**Cuadro 3.2** Valores de pendiente y ordenada al origen de las ecuaciones lineales de  $T_{l(50)}$  en función del tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) para distintos contenidos hídricos en las semillas ( $CHS$ ). Las ecuaciones lineales fueron desarrolladas de acuerdo a la función lineal:  $Y = a \cdot X + b$ ; donde  $a$  es la pendiente de la función,  $X$  es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) y  $b$  es ordenada al origen.  $R^2$  es el coeficiente de determinación del ajuste del modelo de regresión lineal.

$CHS$ (%)	Pendiente de la función*	Ordenada al origen de la función*	$R^2$
$\leq 9$	-	-	-
$\geq 9$ y $\leq 15$	-	-	-
15	0	15,2 (a)	-
17	0,017 (a)	15,6 (a)	0,96
19	0,030 (b)	15,5 (a)	0,96
24	0,036 (c)	15,2 (a)	0,90
33	0,047 (d)	15,5 (a)	0,87
41	0,046 (d)	15,4 (a)	0,83

\*Test de pendientes ( $P$  value =  $<0.0001$ ), valores con una letra común no son significativamente diferentes.

Para independizar el efecto del  $CHS$  del de la temperatura durante la inducción en dormición secundaria, se construyó una variable similar a la desarrollada para el modelo de salida de la dormición primaria. Esta variable considera los cambios en la dormición de las semillas en función del  $CHS$  como la tasa de cambio de  $T_{l(50)}$  por unidad de tiempo térmico de inducción en dormición  $DI_{tt}$  ( $\Delta T_{l(50)} / \Delta DI_{tt}$ ), que es el valor de las pendientes de la relaciones lineales graficadas en la figura (3.7 b) y que se muestran en la Cuadro (3.2). Graficando el valor de esta variable en función de  $CHS$ , se construyó la relación que se muestra en la figura (3.8). La relación que se muestra en la figura (3.8) constituye un modelo predictivo de la tasa de inducción en dormición secundaria en semillas de *P. aviculare* (medida como cambios en  $T_{l(50)}$ ) en función de las temperaturas que inducen en dormición y del contenido hídrico de las semillas durante el proceso de inducción en dormición secundaria.



**Figura 3.8** Estimación de los valores para el ajuste del modelo a partir de la temperatura del límite inferior ( $T_{l(50)}$ ) y la acumulación de  $DI_{tt}$  para semillas de *P. aviculare* (valores derivados de las curvas simuladas mostradas en la Fig. 3.6) en función de los días de inducción en dormición secundaria y los diferentes contenidos hídricos obtenidos en las semillas. Modelo propuesto sobre la base de la relación entre los parámetros de dormición ( $T_{l(50)}$ ) de la población de semillas y las unidades de tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) en función del *CHS*. Las líneas de puntos verticales representan el valor umbral a partir del cual la entrada en dormición secundaria tiene lugar (15%) y la tasa con la cual son inducidas es dependiente del *CHS*. Por encima de 31% *CHS* la tasa de inducción en dormición es máxima.

### 3.3.7 Validación del modelo

La “performance” del modelo de salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria en función de la disponibilidad hídrica y de la temperatura, se evaluó utilizando datos de un experimento independiente en condiciones de campo, donde las semillas permanecieron enterradas en el campo durante otoño, invierno y primavera del 2015 (abril – noviembre) (Fig. 3.9). Para contrastar las predicciones obtenidas por los modelos contra los datos obtenidos en cada una de las exhumaciones en el experimento a campo, los valores de  $T_{l(50)}$  y *CHS* fueron simulados utilizando las ecuaciones (3.1 - 3.3; las funciones obtenidas de los modelo en las figuras (3.5 y 3.8); Cuadros (3.1 y 3.2), respectivamente) en relación a la temperatura media diaria y el contenido hídrico en el suelo (%) registrados a 5 cm de profundidad. Para determinar los valores de  $T_{l(50)}$  durante la salida de la dormición primaria, se acumuló  $S_{tt}$  cada vez que la temperatura media diaria registrada a 5 cm de profundidad se encontró por debajo de 17 °C (Batlla y Benech-Arnold, 2003). En cambio, para determinar los valores de  $T_{l(50)}$  durante la inducción en dormición secundaria, se acumuló  $DI_{tt}$  cada vez que la temperatura media diaria registrada a 5 cm de profundidad se encontró por encima de 7,9 °C (Capítulo 2). En resumen, los cambios en  $T_{l(50)}$  serán el resultado de los °Cd acumulados en función de la temperatura del suelo, y dependiendo de cuál modelo acumula más °Cd ( $S_{tt}$  o  $DI_{tt}$ ), será el modelo que predomine.

**Cuadro 3.3** Valores estimados de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ), temperatura del límite inferior del rango térmico permisivo para la germinación ( $T_{l(50)}$ ), contenido hídrico en las semillas ( $CHS\%$ ), desviación standard de la temperatura del límite inferior del rango térmico permisivo para la germinación ( $\sigma_{Tl(50)}$ ), para diferentes exhumaciones a campo realizadas en el 2015. Los valores en color rojo indican que la población de semillas se encuentra completamente dormida.

Fecha Exh	Temp med	$S_{tt}$ (°Cd)	CHS (%)	$T_{l(50)}$ *	$\sigma_{Tl(50)}$	$T_{l(50)}$ **
27/03	12,5	0	0	18,5	0	18,5
21/05	15,6	77	20,9	17,5	0,4	18,3
05/06	7,8	215	22	16,6	2,2	17,9
20/06	6,5	373	27,9	15,5	4,2	16,9
05/07	10,5	470	33	14,8	3,2	15,7
20/07	15,5	493	36,9	14,6	2,3	15,0
04/08	15,3	518	33,1	14,4	2,4	15,4

Fecha Exh	Temp med	$DI_{tt}$ (°Cd)	CHS (%)	$T_{l(50)}$ *	$\sigma_{Tl(50)}$	$T_{l(50)}$ **
19/08	13	71	26,7	16,1	2,4	15,8
03/09	15,1	101	24,1	17,6	2,4	15,1
18/09	17,3	132	19,8	18,5	0	18,5
03/10	19	155	21,2	18,5	0	18,5
03/11	20	169	18,5	18,5	0	18,5

\*  $T_{l(50)}$  calculada sin considerar el CHS.

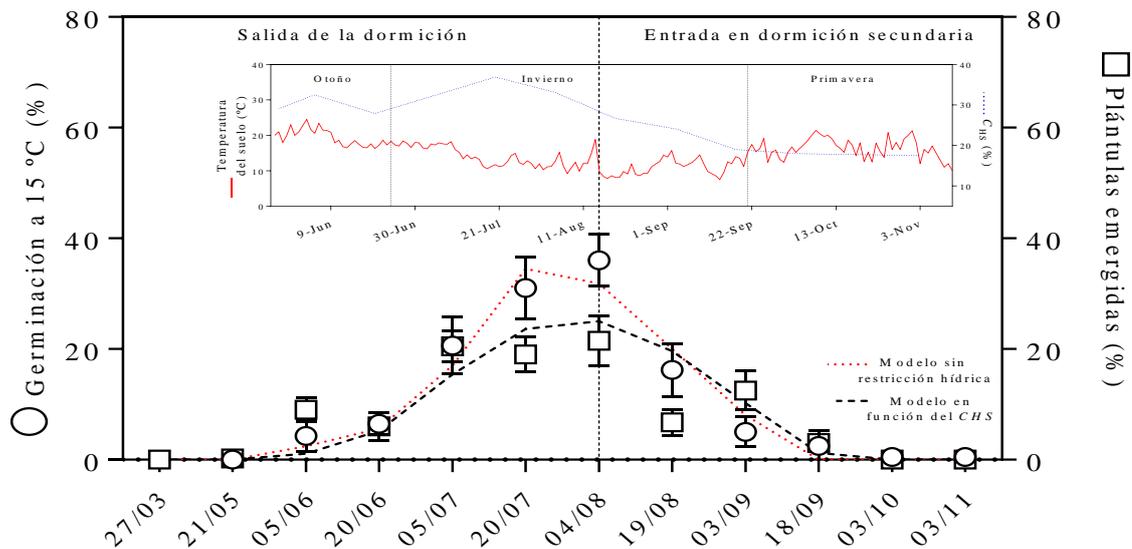
\*\*  $T_{l(50)}$  afectada por el CHS.

Para ejemplificar la forma de utilización de estos modelos, en la Cuadro (3.3) se muestra la estimación de los parámetros en función de la temperatura y del contenido hídrico del suelo para semillas de *P. aviculare* enterradas a 5 cm en el suelo. El modelo de salida de la dormición primaria funciona de la siguiente manera: por debajo de 15% la tasa de cambio de  $T_{l(50)}$  por unidad de  $S_{tt}$  acumulado es cero; entre 15% y 30% esa tasa de cambio aumenta linealmente cuando aumenta el CHS hasta llegar a un máximo en 30%; por encima de 30% esa tasa de cambio se mantiene máxima. Partiendo de un valor de  $T_{l(50)}$  inicial conocido (18,5°C, valor para una población con un alto nivel de dormición (Batlla y Benech-Arnold, 2003)) es posible calcular el valor de  $T_{l(50)}$  en cualquier momento después de haber acumulado una cierta cantidad de unidades térmicas de  $S_{tt}$ , afectándola por el valor de la tasa de cambio de  $T_{l(50)}$  por unidad de  $S_{tt}$  por encima de 15% de CHS, tal como se muestra en la Cuadro (3.3).

En cambio, el modelo de inducción en dormición funciona de forma opuesta: por debajo de 15% la tasa de cambio de  $T_{l(50)}$  por unidad de  $DI_{tt}$  acumulado es mínima (mínimos cambios en  $T_{l(50)}$ ); entre 15% y 31% esa tasa de cambio de inducción en dormición aumenta linealmente cuando aumenta el CHS hasta llegar a un máximo en 31%; por encima de 31% esa tasa de inducción en dormición se mantiene máxima. Partiendo de un valor de  $T_{l(50)}$  inicial conocido (7,5 °C, valor para una población con un bajo nivel de dormición, Capítulo 2) es posible calcular el valor de  $T_{l(50)}$  en cualquier momento después de haber acumulado una cierta cantidad de unidades térmicas de  $DI_{tt}$ , afectándola por el valor de la tasa de cambio de  $T_{l(50)}$  por unidad de  $DI_{tt}$  por encima de 15% de CHS, tal como se muestra en la Cuadro (3.3).

Los porcentajes de germinación predichos por los modelos coincidieron en buena medida con los valores de germinación observados para cada tiempo de exhumación a campo; sin embargo, los valores de germinación obtenidos a 15 °C constante fueron

levemente subestimados (semillas sin restricción hídrica) (Fig. 3.9). Las semillas exhumadas durante los primeros días de otoño presentaron porcentajes bajos de germinación (6% a 15 °C y 8% campo al 20/06/15), estos valores son consistentes con los valores de  $T_{l(50)}$  en función del  $S_{tt}$  y el  $CHS$  prevaleciente (altos valores de  $T_{l(50)} = 16,9$  °C y pocos °Cd de  $S_{tt}$  acumulados) (Cuadro 3.3). El valor de  $CHS$  (%) al momento de la exhumación (27,9%) no fue limitante; sin embargo, los bajos porcentajes de germinación se debieron a que la población de semillas presentaba un nivel de dormición alto al momento de la exhumación. Luego, a finales del invierno se alcanzaron los mayores porcentajes de germinación (disminución de  $T_{l(50)} = 15,4$  °C), 35% para semillas que fueron incubadas a 15 °C y 22% a campo para la misma fecha de exhumación (04/08/15). Estos cambios en  $T_{l(50)}$  estuvieron favorecidos por un valor óptimo de  $CHS$  de 33,1%, valor por encima del cual la tasa de salida de la dormición es máxima. No obstante, un valor del 22% de germinación a campo, podría representar un serio problema cuando el banco de semillas es muy numeroso. Finalmente, los resultados a campo mostraron que la entrada en dormición secundaria ocurrió a partir del 04/08/15 (Fig. 3.9 línea punteada vertical; Cuadro 3.3) momento a partir del cual los porcentajes de germinación disminuyeron paulatinamente hasta volverse cero a finales de la primavera (incremento de la  $T_{l(50)}$  por el aumento de la temperatura en primavera). La disminución en los porcentajes de germinación estuvo acompañada por un incremento en el nivel de dormición y una disminución en el  $CHS$ .



**Figura 3.9** Porcentajes de germinación obtenidos en dos condiciones: i) condiciones controladas (incubadas a 15 °C) y ii) en condiciones de campo para semillas de *P. aviculare*, enterradas en el suelo a finales de marzo del 2015 (dispersión natural en marzo) hasta finales de primavera (otoño, invierno y primavera). La línea negra punteada representa la germinación predicha en función del  $CHS$ , la línea roja punteada representa la germinación predicha sin restricción hídrica. Germinación observada (círculos) en condiciones controladas y germinación obtenida en condiciones de campo (cuadros). La línea punteada vertical en 04/08/2015 indica el momento en que la población de semillas se induce en dormición secundaria. La figura superior representa las condiciones de temperatura y contenido hídrico medio durante el experimento a campo. Los datos de germinación se simularon utilizando ecuaciones del modelo de salida ( $S_{tt}$ , Batlla y Benech-Arnold, 2003) y entrada en dormición secundaria ( $DI_{tt}$ , índice desarrollado en el capítulo 2), utilizando las ecuaciones (3.1 – 3.4) y las variables derivadas de los modelos (Fig 3.5 y Fig.3.8b). Las barras verticales indican el error estándar (SE) y donde no hay barras se muestra que el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

### 3.4. Discusión

En condiciones naturales, las semillas están expuestas a ciclos de humedecimiento y secado en función del patrón temporal de lluvias (Hegarty, 1978; Allen y Meyer, 1998; Bewley, 2007). Las semillas se humedecen luego de una lluvia y, a partir de ese momento comienza una fase de deshidratación a medida que el suelo se va secando hasta que una nueva lluvia determina la re-imbibición de las semillas y vuelve a recomenzar el ciclo (Karssen, 1982; Batlla y Benech-Arnold, 2006). El efecto de estas fluctuaciones de humedecimiento-secado en las semillas fueron estudiadas por varios autores, y de su estudio se sugirió que las mismas podrían afectar el nivel de dormición de las semillas, y por lo tanto, el patrón anual de emergencia en el campo (Hegarty, 1978; Baskin y Baskin, 1982; Bouwmeester, 1990; Allen et al., 1993; Batlla y Benech-Arnold, 2006). Aún así, la mayoría de los modelos desarrollados para predecir cambios en el nivel de dormición en semillas enterradas contemplan el efecto de la temperatura sobre el nivel de dormición, pero no toman en cuenta el efecto del contenido hídrico del suelo sobre la dormición de las semillas.

Los modelos de umbral permiten describir con precisión el rango de respuestas de los individuos dentro de una población, dependiendo de cuales sean las condiciones ambientales (Bewley, 1997; Finch-Savage, 2004). Los modelos presentados en este Capítulo permitieron identificar dos umbrales de *CHS*, un valor mínimo de *CHS* requerido para activar los procesos metabólicos indispensables en las semillas (donde la tasa del proceso es mínima) y un valor donde la tasa de los procesos metabólicos es máxima. En estudios anteriores usando semillas de avena silvestre (*Avena fatua*) y arroz rojo (*Oryza punctata*), Foley (1994) y Leopold et al. (1988) mostraron que el proceso de post-maduración podría volverse lento o no ocurrir directamente a muy bajo contenido de agua en la semilla. Estos umbrales identificados determinan que el metabolismo de las semillas ocurra a una tasa diferente dependiendo del *CHS*, y a su vez, determinan que los cambios a nivel transcripcional (por encima y por debajo de esos umbrales) empiezan a ser más rápidos o más lentos. Por lo tanto, para que los procesos metabólicos en la semilla tengan lugar es necesario que las semillas tengan un nivel de humedad adecuado.

En este Capítulo, se presentaron resultados que demuestran que el *CHS* en semillas de *P. aviculare* tiene un papel importante en la regulación de los cambios en el nivel de dormición, tanto durante la salida de la dormición primaria como en la entrada en dormición secundaria (Fig. 3.4 a y 3.7 a). Estos cambios fueron cuantificados a partir de variaciones en la  $T_{1(50)}$  durante el tiempo de estratificación en función de los diferentes *CHS* con los que fueron estratificadas las semillas o inducidas a dormición secundaria (Fig. 3.4 b y 3.7 b). Los resultados mostraron que, para la salida de la dormición primaria, la tasa con la que la  $T_{1(50)}$  disminuye depende del *CHS* que presentan las semillas; cuanto más alto es el *CHS*, mayor es la tasa de salida hasta un valor de 31% a partir del cual la tasa de salida es máxima (Fig. 3.4 a, b). El rango de *CHS* explorado en las semillas de *P. aviculare* (7-64%) permitió identificar un valor umbral mínimo de 15% de *CHS*, a partir del cual la temperatura modifica el nivel de dormición durante la estratificación (Fig. 3.5). Resultados similares fueron encontrados por Wang et al. (2009), quienes observaron que la salida de la dormición a bajas temperaturas en *Vitis vinicola* era nula por debajo del 20% de humedad de la semilla, para luego aumentar hasta hacerse máxima en 40% de humedad, permitiendo determinar un umbral mínimo y un valor óptimo de humedad para que las semillas vean aliviada su dormición. Por otro lado, un valor umbral del 15% de *CHS* implica que para el caso de *P. aviculare* las semillas necesitaron acumular 3% de contenido hídrico respecto al valor inicial de *CHS* luego de la dispersión (12% *CHS*), para que el proceso de estratificación comenzara a tener lugar. Cuando el *CHS* fue menor al

valor umbral (<15%) las semillas permanecieron dormidas, sin modificaciones en el nivel de dormición a lo largo del período de estratificación (Fig. 3.4a). Estos resultados muestran que, por un lado, la salida de la dormición primaria requiere un valor mínimo de *CHS* y, por otro lado, que valores bajos de *CHS* en semillas de *P. aviculare* (aunque por encima del 15%) permiten que el proceso de estratificación tenga lugar en los bancos de semillas y, por lo tanto, se modifique el nivel de dormición de los mismos (Fig. 3.5).

Durante la entrada en dormición secundaria, el *CHS* reguló los cambios en el nivel de dormición de dos formas: 1) el *CHS* reguló por sí solo la entrada en dormición secundaria cuando el *CHS* fue llevado por debajo de 15%, independientemente de la temperatura (Fig. 3.6 y 3.7). 2) La inducción en dormición secundaria ocurrió a una tasa diferente a partir de *CHS* >15%: cuanto mayor fue el *CHS* mayor fue la tasa con la cual las semillas fueron inducidas en dormición (Fig. 3.7). Los resultados encontrados para *P. aviculare* son similares a los reportados para *Bromus tectorum*, donde la salida de la dormición tiene lugar dentro de un rango muy específico de valores de humedad de la semilla (no ocurre en semillas embebidas o en semillas muy secas) y, dentro de ese rango, el nivel de hidratación de la semilla modula el efecto de la temperatura sobre la tasa de salida de la dormición (Bair et al., 2006). Estos resultados sugieren que cuando el suelo se seca abruptamente (disminución importante de la disponibilidad hídrica), las semillas entran en dormición secundaria rápidamente para evitar no germinar, y prevenir una temporada adversa en la cual las plántulas emergidas no podrían sobrevivir.

Interesantemente, las evidencias muestran que el valor umbral identificado para ambos modelos se corresponde a 15% de *CHS* (el proceso que tenga lugar; salida o entrada en dormición secundaria dependerá, tanto del *CHS* como de la temperatura predominante por encima de este umbral). A partir de estos umbrales identificados es posible relacionar cambios en la dormición de las semillas en función del *CHS* como la tasa de cambio de  $T_{l(50)}$  por unidad de tiempo térmico de estratificación  $S_{tt}$  ( $\Delta T_{l(50)} / \Delta S_{tt}$ ) y tiempo térmico de inducción en dormición  $DI_{tt}$  ( $\Delta T_{l(50)} / \Delta DI_{tt}$ ) (Fig. 3.5 y 3.8). Dicho de otra manera, la tasa con la cual las semillas salen de la dormición o son inducidas en dormición secundaria, será el resultado de los cambios en la  $T_{l(50)}$  por unidad de tiempo térmico acumulado ( $^{\circ}\text{Cd}$ ) en función del *CHS*. Estos resultados sugieren que no sólo la temperatura tiene un efecto sobre los cambios en el nivel de dormición, sino que también la disponibilidad hídrica en los bancos de semillas estaría jugando un papel importante como modulador de esos cambios dependiendo del nivel de hidratación de las semillas.

Los modelos predictivos de los cambios en el nivel de dormición en semillas de *P. aviculare* propuestos en este Capítulo, permitieron llevar a cabo simulaciones de los patrones temporales de salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria en función de la temperatura del suelo y la disponibilidad hídrica de semillas enterradas (Fig. 9; Cuadro 3.3). Los resultados presentados en este trabajo se encuentran entre los primeros en cuantificar el efecto del contenido de humedad de las semillas durante el período de estratificación sobre la tasa de salida de la dormición primaria. Más aún, es la primera vez que se presenta un trabajo donde se cuantifica el efecto del contenido hídrico de las semillas sobre la tasa de inducción en dormición secundaria. Los modelos desarrollados representan una novedosa herramienta que permiten estimar con una mayor precisión la fracción de la población capaz de germinar durante la salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria en función de las variables desarrolladas para cada modelo.

En conclusión, los modelos presentados en este trabajo representan una aproximación dinámica para caracterizar y modelar la salida de la dormición primaria y la inducción en dormición secundaria en semillas de *P. aviculare* en relación con la

disponibilidad hídrica y la temperatura, teniendo en cuenta la  $T_{l(50)}$  y su desvío estándar  $\sigma_{TI}$  como parámetros que nos permiten medir la dormición. Sin embargo, el estudio de la dormición y la emergencia de los bancos de semillas en condiciones de campo se encuentran influenciados por la interacción de muchos factores ambientales como luz, fluctuaciones de temperatura, contenido de nitratos, etc (Bewley y Black, 1982; Benech-Arnold et al., 1990a; Scopel et al., 1991, Ghera et al., 1992; Benech-Arnold et al., 2000). El desarrollo de modelos predictivos que incluyan el efecto de estos factores ambientales sobre la dormición y la germinación de las poblaciones de semillas, nos conducirán a mejorar nuestro entendimiento y nuestras predicciones de los patrones de emergencia de malezas observados en el campo.



## **CAPÍTULO 4**

**CAMBIOS EN EL NIVEL DE DORMICIÓN EN SEMILLAS  
DE *Polygonum aviculare* L. DURANTE LA INDUCCIÓN EN  
DORMICIÓN SECUNDARIA, MEDIDOS A PARTIR DE  
CAMBIOS EN LA SENSIBILIDAD A LA LUZ Y A LAS  
TEMPERATURAS ALTERNADAS**



## CAPÍTULO 4

### 4. CAMBIOS EN EL NIVEL DE DORMICIÓN EN SEMILLAS DE *Polygonum aviculare* L. DURANTE LA INDUCCIÓN EN DORMICIÓN SECUNDARIA, MEDIDOS A PARTIR DE CAMBIOS EN LA SENSIBILIDAD A LA LUZ Y A LAS TEMPERATURAS ALTERNADAS

#### 4.1 Introducción

Las señales relacionadas con los cambios estacionales influyen directamente en el comportamiento que tienen las semillas en los bancos de semillas. En respuesta a estas señales, las semillas modifican su nivel de dormición constantemente y su sensibilidad a otras señales ambientales (Footitt et al., 2011; Finch-Savage y Footitt, 2015). La temperatura es la señal más importante para la detección temporal (Probert, 2000), mientras que muchas señales pueden usarse para detectar condiciones beneficiosas y adversas para la germinación, por ejemplo, profundidad en el suelo (amplitud de la fluctuación de temperatura diurna, oxígeno, agua), alteración del suelo (luz, oxígeno) y gaps en la vegetación (nitrato, calidad de la luz, el grado de fluctuación de la temperatura diurna) (Benech-Arnold et al., 2000; Baskin y Baskin, 2006; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Batlla et al., 2007; Footitt et al., 2011, 2013, 2014). Como se mencionó anteriormente, el nivel de dormición cambia constantemente, muchas veces cuando el nivel de dormición de una población de semillas es suficientemente bajo, algunas especies requieren de la exposición a ciertas señales ambientales específicas que actúan como terminadores de la dormición, las cuales eliminarán las últimas impedancias para dar paso al proceso de germinación (Scopel et al., 1991; Ghera et al., 1992; Benech-Arnold et al., 2000). Entre los factores terminadores de la dormición más estudiados se encuentran la luz y las temperaturas alternadas, ya que éstos son los que comúnmente presentan mayores efectos en condiciones de campo. Aún así, existen muchos otros factores que actúan como terminadores de la dormición bajo condiciones específicas, como nitratos, etileno, dióxido de carbono, etc. (Benech-Arnold et al., 2000).

En algunas especies, la luz puede promover o inhibir la germinación dependiendo de su composición espectral y de su nivel de irradiancia, del estado fisiológico de las semillas y de las condiciones ambientales, en particular la temperatura y la disponibilidad hídrica del suelo (Bewley y Black, 1994; Casal y Sánchez 1998; Batlla y Benech-Arnold, 2007, 2010). Es conocido que la promoción de la germinación por la luz está mediada por los fitocromos (Bewley y Black, 1982; Taylorson, 1972, 1987; Pons, 1992; Benech-Arnold et al., 2000). Algunas semillas muestran, bajo ciertas condiciones, una sensibilidad extrema a la luz (Casal y Sánchez, 1998, Botto et al., 1998, 2000). En esos casos, las exposiciones de milisegundos a la luz solar son suficientes para inducir la germinación; esto se conoce como una respuesta de muy baja fluencia (del inglés, *very low fluence responses*, VLFR), que en *Arabidopsis thaliana* está mediada por el fitocromo A (*PHY-A*) (Botto et al., 1996, Shinomura et al., 1996). Esta respuesta se satura con niveles muy bajos de la forma Pfr (la forma activa para la germinación) del fitocromo (menos del 1 por ciento del fitocromo total [Pt] en la forma Pfr) y no muestra la clásica reversibilidad de luz roja (R) - rojo lejano (RL) (Mandoli y Briggs, 1981; Casal, Sánchez y Botto, 1998; Casal, 2013). Este modo de acción de los fitocromos les permite a las semillas detectar breves exposiciones a la luz durante las perturbaciones del suelo, como las que ocurren durante las labores de labranza agrícola (Scopel et al., 1991, 1994; Batlla

y Benech-Arnold, 2004, 2007). Existe otro modo de acción de los fitocromos y su respuesta se expresa a baja fluencia (del inglés, *low fluence responses*, LFR). Esta respuesta se caracteriza por la existencia de una correlación entre la intensidad del efecto y el nivel de Pfr que se establece por efecto del ambiente lumínico (Taylorson y Hendricks, 1972; Lee y Lopez-Molina, 2012). Los fotorreceptores de este modo de acción identificados en las semillas de *Arabidopsis thaliana* son los fitocromos B y E (*PHY-B* y *PHY-E*) (Hennig et al., 2001). Por lo tanto, las respuestas del tipo VLFR y las del tipo LFR difieren en que los niveles extremadamente bajos de Pfr saturan el VLFR y la respuesta a menudo no es reversible por la luz FR, mientras que niveles más altos de Pfr son necesarios para provocar LFR y la respuesta al R es reversible si es seguida inmediatamente por luz FR (Casal y Sánchez, 1998).

Por otro lado, las temperaturas alternadas también actúan como un factor terminador de la dormición en semillas de numerosas especies (Probert et al., 1985; Murdoch et al., 1989; Probert, 1992). Para semillas que se encuentran en el banco de semillas, las temperaturas alternadas como factor terminador de la dormición constituyen una señal ambiental confiable en algunas situaciones. Por ejemplo, por debajo de los primeros milímetros de profundidad la influencia del ambiente lumínico es nula (Bliss y Smith, 1985, Tester y Morris, 1987; Pons, 2000), mientras que, la amplitud térmica del suelo se va atenuando a medida que aumenta la profundidad (Van Esso et al., 1986). Thompson y Grime (1983), propusieron que el papel ecológico de este requerimiento radica en la posibilidad de detectar la profundidad de entierro de las semillas y la presencia de brechas en la cobertura vegetal (canopeo).

Los cambios en el nivel de dormición no sólo comprenden cambios en el rango de temperaturas permisivas para la germinación, sino que también comprenden cambios en la sensibilidad de la población de semillas a los efectos de estos factores terminadores de la dormición (Benech-Arnold et al., 2000). Por ejemplo, en el caso de semillas que requieren del estímulo lumínico para terminar la dormición, Derkx y Karssen (1994) observaron que la dinámica de los cambios en el nivel de dormición en semillas de *Arabidopsis thaliana* L. exhumadas del campo, se correlacionaban con los cambios observados en la sensibilidad a la luz de la población de semillas; la sensibilidad aumentaba cuando la población salía de la dormición y disminuía cuando aumentaba el nivel de dormición. En forma análoga, para el caso de semillas que requirieron de fluctuaciones de temperatura para terminar la dormición, Benech-Arnold et al., (1990a, b) mostraron que el tamaño de la fracción de la población de semillas de *Sorghum halepense* L. que responde al efecto estimulante de las fluctuaciones de temperatura aumentaba como consecuencia de un período de entierro bajo temperaturas invernales. Benech-Arnold et al., (1990a, b) observaron que ese incremento, también se encontraba acompañado por cambios en el número y en la amplitud de los ciclos de temperaturas fluctuantes requeridos para terminar la dormición. Por ejemplo, semillas de *S. halepense* que habían transcurrido un invierno enterradas en el suelo, requerían exposiciones a un menor número de ciclos de temperaturas alternadas para terminar la dormición, y adquirirían la capacidad de responder a ciclos de menor amplitud térmica.

En condiciones de campo las semillas están expuestas constantemente a los efectos de diferentes condiciones de luz y fluctuaciones diarias de temperatura (Jensen, 1995; Batlla et al., 2000; Batlla et al., 2003). Debido a ello, el porcentaje final de semillas que emergerá en un tiempo dado, será el resultado de la fracción de la población que pueda germinar a la temperatura prevaleciente en el suelo, más la fracción que pueda ser liberada de la dormición debido al efecto del régimen prevaleciente de fluctuación térmica o la sensibilidad que puedan presentar a la luz. Batlla y Benech-Arnold (2005) y

Batlla et al. (2003) desarrollaron modelos que permiten cuantificar esos cambios en la sensibilidad que presentan las semillas a la luz y las temperaturas alternadas durante la salida de la dormición primaria en semillas de *Polygonum aviculare*. Estos autores se basaron en el índice de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) (Batlla y Benech-Arnold, 2003) cuyo valor acumulado como resultado de temperaturas invernales por debajo del umbral (i.e. 17 °C) se pudo relacionar con cambios en la sensibilidad a la luz de acuerdo con la temperatura experimentada por las semillas enterradas en el suelo. Análogamente, Batlla et al. (2003) desarrollaron un modelo capaz de predecir la fracción de semillas a germinar en función del número de ciclos de temperaturas alternadas experimentados y del nivel de dormición alcanzado durante el proceso de salida de la dormición primaria. Sin embargo, se desconoce cómo cambia la sensibilidad a la luz y a los ciclos de temperaturas alternadas durante la inducción en dormición secundaria, ni se han establecido aún relaciones cuantitativas como en el caso de la salida de la dormición primaria. La cuantificación de los cambios en la respuesta de las semillas a estos factores ambientales terminadores de la dormición durante la entrada en dormición secundaria y la inclusión de los mismos en un modelo que contemple una simulación cíclica de los cambios en el nivel de dormición, podrían conducir a una predicción más ajustada del patrón de emergencia en condiciones de campo.

En el presente capítulo, se presentan resultados de experimentos llevados a cabo con el fin de determinar en forma cuantitativa el efecto de las temperaturas que inducen en dormición secundaria sobre los cambios en la sensibilidad a la luz y a los ciclos de fluctuaciones de temperatura en semillas de *Polygonum aviculare*.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Recolección y preparación del material vegetal**

La metodología empleada fue descrita en el Capítulo 2 (ver “*Materiales y métodos, recolección y preparación del material vegetal*”).

### **4.2.2 Salida de la dormición primaria**

La metodología empleada fue descrita en el Capítulo 2 (ver “*Materiales y métodos, Salida de la dormición primaria*”).

### **4.2.3 Inducción en dormición secundaria**

Grupos de semillas fueron dispuestas en bolsas de malla de nylon y enterradas en macetas que contenían un sustrato húmedo (tierra, arena y vermiculita) y almacenadas a 5 °C durante 125 días (de manera tal de acumular 1500 °Cd, de acuerdo con la ecuación 4.1 y lograr un bajo nivel de dormición). Luego, estas semillas estratificadas y que habían alcanzado un nivel de dormición bajo fueron expuestas a diferentes temperaturas que inducen en dormición secundaria (10, 15, 20, 25 °C) por diferentes tiempos (10 °C = 0, 7, 12, 16, 26 y 36 días; 15 °C = 0, 6, 11, 18, 25, 32 días; 20 °C = 0, 2, 4, 8, 10, 12 y 25 °C = 0, 1, 3, 5, 7, 9). A los diferentes intervalos de tiempo durante la inducción en dormición secundaria, cuatro bolsas de malla de nylon que contenían las semillas (cuatro repeticiones), fueron exhumadas de las macetas colocadas a cada una de las temperaturas y expuestas a las condiciones de los experimentos 1 y 2 explicados más abajo. Durante el tiempo de inducción en dormición secundaria, la temperatura del suelo en las macetas se registró en forma horaria utilizando sensores de temperatura (RC-30B, *Temperature Data-Logger, Schwyz*).

#### 4.2.4 Experimento 1. *Cambios en la sensibilidad a la luz durante la entrada en dormición secundaria*

##### 4.2.4.1 *Test de germinación*

Para caracterizar los cambios en el nivel de dormición a partir de cambios en la sensibilidad a la luz durante la entrada en dormición secundaria, las semillas exhumadas durante la salida de la dormición primaria y la entrada en dormición secundaria fueron dispuestas en cajas de Petri, con doble papel de filtro y 5 ml de agua destilada. Luego, las cajas de Petri conteniendo las semillas fueron expuestas a distintos tratamientos lumínicos que determinan diferentes proporciones de fitocromo activo (Pfr/Pt) según Batlla y Benech-Arnold (2005). Los tratamientos lumínicos se describen a continuación:

##### Tratamientos lumínicos:

Pfr/Pt = 76%: 60 minutos de exposición a luz roja de una intensidad de  $28 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (LFR).

(2) Pfr/Pt = 3%: 20 minutos de exposición a luz rojo lejano de una intensidad de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (VLFR).

(3) Pfr/Pt =  $7.6 \times 10^{-4}\%$ : 10 segundos a luz rojo lejano con una intensidad de  $0.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (VLFR).

(4) Oscuridad: en este tratamiento, 4 repeticiones envueltas en bolsas oscuras fueron expuestas al tratamiento 1 (60 min bajo luz roja).

La luz roja fue proporcionada por tubos fluorescentes de 40W (Philips 40/15, Alemania) en combinación con un filtro de agua y filtros de acetato rojo (La casa del acetato, Buenos Aires, Argentina). La luz roja lejana fue proporcionada por una lámpara reflectora incandescente de 150 W (Phillips R95, Buenos Aires, Argentina) en combinación con un filtro de agua y un filtro RG9 (Schott, Mainz, Alemania). En el tratamiento 3 ( $7.6 \times 10^{-4}$  Pfr/Pt), la tasa de fluencia de la lámpara incandescente se redujo mediante un reóstato para obtener un flujo de fotones más bajo. Durante la exposición de las semillas a los tratamientos de luz, la temperatura en los gabinetes se mantuvo en 17 °C (cuarto oscuro controlado con aire acondicionado).

Luego de la exposición a los distintos tratamientos lumínicos, las cajas de Petri fueron envueltas en bolsas opacas y fueron dispuestas en una cámara de temperatura constante de 15 °C. Luego de 15 días de incubación a 15 °C se realizó el conteo de las semillas germinadas para cada tratamiento. El criterio para registrar germinación fue el crecimiento radicular de más de 2 mm y las semillas germinadas fueron retiradas después de cada conteo. Las exhumaciones y el acondicionamiento de las semillas correspondientes al tratamiento 1, 2 y 3 se realizaron bajo luz verde muy tenue (luz proporcionada de un tubo fluorescente filtrada por filtros verdes, La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina). La temperatura en cada cámara fue registrada cada hora durante el tiempo de incubación por medio de sensores de temperatura (RC – 30B *Temperature Data-Logger*, Schwyz).

##### 4.2.4.2 *Desarrollo del modelo*

El objetivo fue establecer relaciones funcionales entre los cambios en la sensibilidad a la luz durante la entrada en dormición secundaria de la población de semillas y la temperatura a la cual son inducidas en dormición secundaria. Teniendo en cuenta que la sensibilidad a la luz se encuentra relacionada con el nivel de dormición que presente la población de semillas, y que la tasa de entrada en dormición secundaria es

mayor cuando más alta es la temperatura de exposición por encima de una temperatura umbral, se utilizó el índice de tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) desarrollado en el Capítulo 2 (ecuación 2.7) para cuantificar el efecto de la temperatura sobre los cambios en la sensibilidad a la luz durante la inducción en dormición secundaria. El mismo se basa en la acumulación de unidades de tiempo térmico por encima de una temperatura umbral a partir de la cual la entrada en dormición secundaria tiene lugar, y permite cuantificar el efecto del tiempo de exposición y las temperaturas sobre el nivel de dormición de la población de semillas utilizando la siguiente función:

$$DI_{tt} = \text{Días} \cdot (T_s - T_{uDI}) \quad \text{Ecuación (4.1)}$$

donde  $DI_{tt}$  es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $^{\circ}\text{Cd}$ ),  $T_{uDI}$  es la temperatura umbral para la inducción en dormición secundaria ( $7,9^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la cual o por debajo de la cual la inducción en dormición no se produce) y  $T_s$  es la temperatura media diaria de almacenamiento. La temperatura umbral de entrada en dormición secundaria para *P. aviculare* fue determinada previamente en el Capítulo 2.

El desarrollo del modelo se basó en los siguientes pasos:

- 1) Determinar la respuesta a los diferentes tratamientos lumínicos, medida como porcentaje de germinación, para semillas exhumadas durante la inducción en dormición secundaria a las siguientes temperaturas: 10, 15, 20 y  $25^{\circ}\text{C}$ .
- 2) Obtener ecuaciones que permitan relacionar los cambios observados en la respuesta a los distintos tratamientos lumínicos con la acumulación de unidades de  $DI_{tt}$  durante la inducción en dormición secundaria.
- 3) Utilizar las ecuaciones derivadas en (2) para predecir la respuesta a los diferentes tratamientos en función de la acumulación de unidades de  $DI_{tt}$ , y validar el modelo con datos independientes obtenidos a campo.

#### 4.2.4.3 Evaluación del modelo

Para evaluar el comportamiento del modelo se utilizaron datos de un experimento realizado en el campo durante el año 2016 (otoño, invierno y primavera). El mismo, fue desarrollado siguiendo una metodología similar a la desarrollada en el Capítulo 3 para el experimento de campo (ver sección “Evaluación del modelo”). En este experimento, las semillas fueron enterradas en el suelo y exhumadas cada 20 días aprox. (abril – noviembre 2016) y fueron expuestas a los diferentes “Tratamientos lumínicos” 1, 2, 3 y 4 detallados anteriormente.

### 4.2.5 Experimento 2. Cambios en la sensibilidad a las temperaturas alternadas durante la entrada en dormición secundaria

#### 4.2.5.1 Test de germinación

Para caracterizar los cambios en la sensibilidad a las temperaturas alternadas durante la inducción en dormición secundaria, las semillas exhumadas durante la salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria fueron colocadas en cajas de Petri con doble papel de filtro y 5ml agua destilada. Luego, fueron expuestas a un pulso saturante de luz roja durante 20 minutos (Ver tratamiento lumínico 1, en **Experimento 1**) y después a diferente número de ciclos (0, 1, 3, 5 o 15) de un régimen de temperaturas fluctuantes  $10/24^{\circ}\text{C}$  (12/12 h). Con número de ciclos, se hace referencia a la cantidad de días que las semillas fueron expuestas a la alternancia de temperaturas dentro de un intervalo de 15 días. Luego de la exposición al número correspondiente de

ciclos, las semillas fueron incubadas en una cámara de germinación a temperatura constante de 15 °C por otros 15 días. El tratamiento de 0 ciclos corresponde a semillas incubadas a una temperatura constante de 15 °C durante 15 días. El número final de semillas germinadas fue determinado al finalizar cada tratamiento de incubación (exposición al número correspondiente de ciclos + 15 días a una temperatura constante de 15 °C). Los cambios en el porcentaje de germinación en función del número de ciclos durante la inducción en dormición secundaria fueron ajustados con la siguiente ecuación propuesta por Batlla et al. (2003):

$$G_n = C \cdot 1 - \exp(-K \cdot N) + G_0 \quad \text{Ecuación (4.2)}$$

donde  $G_n$  es el porcentaje de germinación obtenido después de  $N$  ciclos de fluctuación de temperatura (10/24 °C),  $C$  es la diferencia entre el porcentaje de germinación obtenido con 0 ciclos = (i.e. 15 °C constante) y  $N$  ciclos,  $K$  es el efecto del número de ciclos ( $N$ ) sobre la germinación de las semillas determinada por la pendiente de la curva de respuesta,  $N$  es el número de ciclos y  $G_0$  es el porcentaje de germinación obtenido para semillas incubadas a temperatura constante (0 ciclos).

#### 4.2.5.2 Desarrollo del modelo

El objetivo fue establecer relaciones funcionales entre los cambios en la sensibilidad de la población de semillas al estímulo de los ciclos de fluctuación de temperatura, y la entrada en dormición secundaria en función de las temperaturas que inducen dormición secundaria según el régimen térmico de exposición (10, 15, 20 y 25 °C). En función de lo expuesto anteriormente, se utilizó el índice de tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) desarrollado en el Capítulo 2 (ecuación 2.7) y la ecuación (4.1) en este Capítulo para cuantificar el efecto de la temperatura sobre los cambios en la sensibilidad a las temperaturas alternadas durante la inducción en dormición secundaria.

El desarrollo del modelo se basó en los siguientes pasos:

- 1) Ajustar funciones que describan la respuesta de las semillas a los ciclos de fluctuaciones de temperatura en función de los datos de germinación obtenidos para diferentes intervalos de unidades de  $DI_{tt}$  acumuladas durante la inducción en dormición secundaria. Para ello, se utilizaron los valores de germinación obtenidos en respuesta al número de ciclos de temperatura fluctuante en los test de germinación, para semillas que acumularon valores similares de  $DI_{tt}$  durante la inducción en dormición secundaria. Esos valores fueron promediados y ajustados usando una única función (ecuación 4.2).
- 2) Derivar ecuaciones que relacionen cambios progresivos en los parámetros de las funciones ajustadas en (1) (parámetros  $C$  y  $K$  de la ecuación 4.2) con la acumulación de unidades de  $DI_{tt}$  durante la entrada en dormición secundaria.
- 3) Usando las ecuaciones derivadas en (2), predecir cambios en los parámetros de las curvas de respuesta para semillas enterradas en el campo y bajo condiciones ambientales controladas.
- 4) Utilizar los valores predichos en (3) para simular los porcentajes de germinación en función del número de ciclos de fluctuaciones de temperatura, y comparar los resultados con datos independientes.

#### 4.2.5.3 Evaluación del modelo

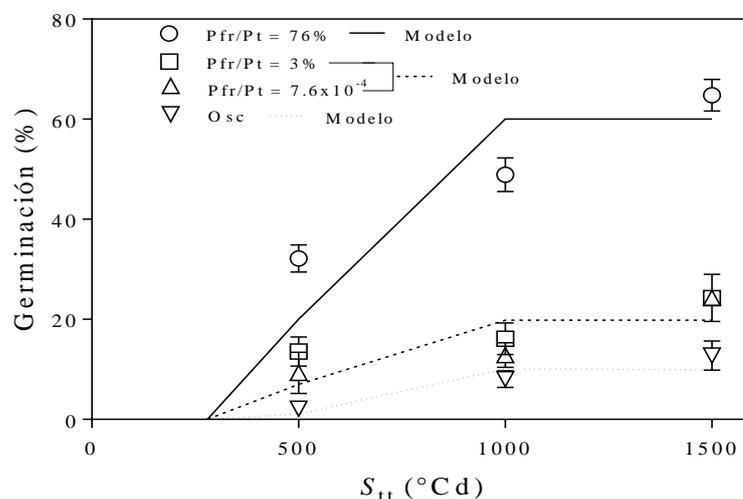
Para evaluar el comportamiento del modelo se utilizaron datos de un experimento realizado en el campo durante el año 2016 (otoño, invierno y primavera). El mismo fue

desarrollado siguiendo una metodología similar a la desarrollada en el Capítulo 3 para el experimento de campo (ver sección “*Evaluación del modelo*”). En este experimento, las semillas fueron enterradas en el campo y fueron exhumadas cada 20 días aprox. (abril – noviembre, 2016) y fueron expuestas a diferentes números de ciclos (0, 5, 10 y 15) a un régimen de temperaturas fluctuantes 10/24 °C (12/12 h) y a un régimen de temperaturas constantes (15 °C), como fue explicado en la sección “*Test de germinación*”.

### 4.3 Resultados

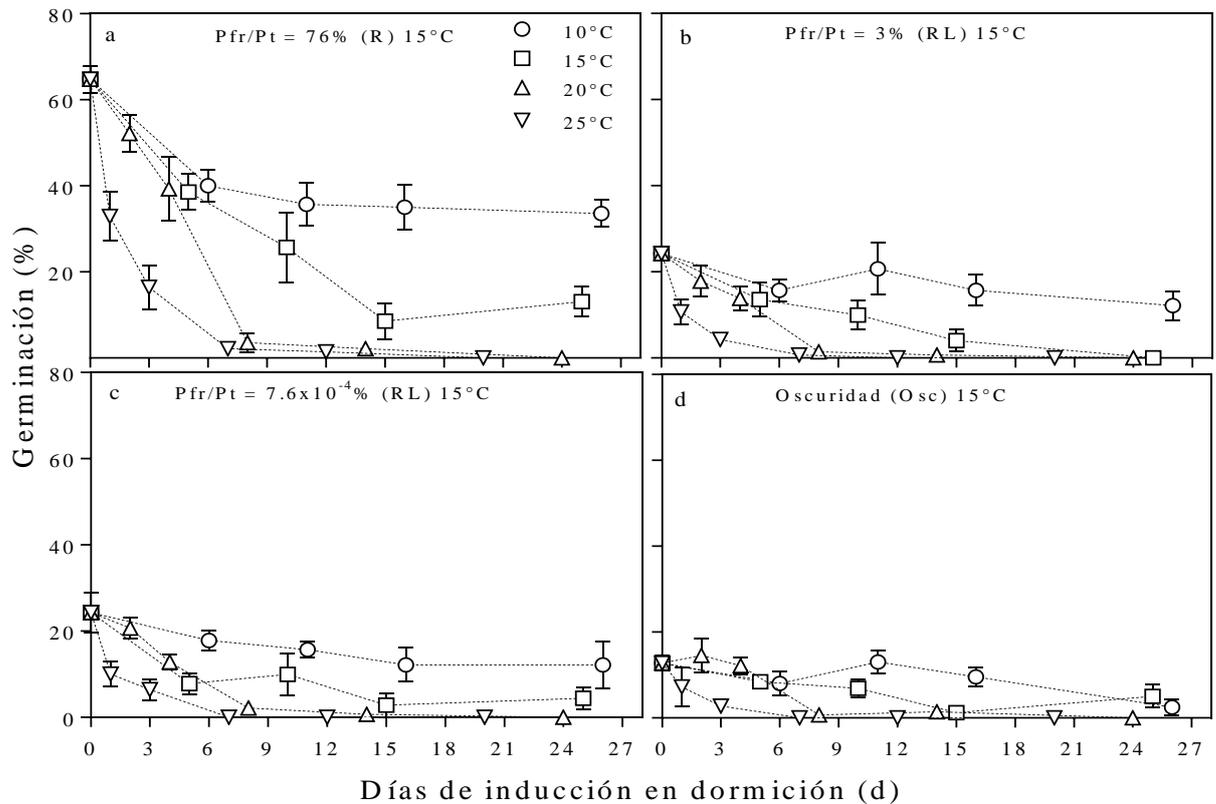
#### 4.3.1 Cambios en la sensibilidad a la luz durante la salida y la entrada en dormición secundaria

Al inicio de los experimentos las semillas recién dispersadas fueron expuestas a los distintos tratamientos lumínicos (Pfr/Pt: 76, 3,  $7.6 \times 10^{-4}\%$  y oscuridad) para verificar el nivel de dormición inicial de la población. La población mostró un alto nivel de dormición por los valores casi nulos de germinación obtenidos (germinación LFR <2%, VLFR 0% y oscuridad 0%). La dinámica de los cambios en los porcentajes de germinación durante la salida de la dormición primaria en función de la acumulación de  $S_{tt}$  (500, 1000 y 1500 °Cd) a 5 °C pudo ser adecuadamente descrita utilizando los modelos tri-lineales desarrollados por Batlla y Benech-Arnold (2005) para predecir los cambios en la sensibilidad a la luz durante la salida de la dormición en semillas de *P. aviculare* (Fig. 4.1). Los porcentajes de germinación simulados para cada tiempo de  $S_{tt}$  fueron adecuadamente ajustados por los modelos, esto permitió calcular la fracción de la población capaz de germinar de acuerdo a los modos de respuesta LFR, VLFR y oscuridad.



**Figura 4.1** Porcentajes de germinación observados y simulados para las semillas de *P. aviculare* durante la salida de la dormición primaria en relación con la acumulación de unidades de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$  = 0, 500, 1000 y 1500 °Cd) (Batlla y Benech-Arnold, 2003). Los símbolos representan los porcentajes de germinación observados para las semillas estratificadas a 5 °C, expuestas a los diferentes tratamientos lumínicos de Pfr/Pt: 76% (círculos); 3% cuadrados);  $7.6 \times 10^{-4}\%$  (triángulos); y para semillas mantenidas en oscuridad (triángulos invertidos). Las líneas representan valores simulados para Pfr/Pt de 76% (línea continua), 3% y  $7.6 \times 10^{-4}\%$  (línea punteada) y semillas mantenidas en oscuridad (línea discontinua). Los modelos presentaron los siguientes  $R^2$ : Pfr/Pt de 76% = 0,91, Pfr/Pt de 3% y  $7.6 \times 10^{-4}\%$  = 0,97 y OSC (oscuridad) = 0,92. Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ SE) y donde no se muestran barras, el SE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

Estos resultados muestran que a medida que se acumulan unidades de  $S_{tt}$ , el nivel de dormición disminuye y la sensibilidad de las semillas a la luz evaluada a partir de cada uno de los tratamientos, se incrementa. No obstante, la dinámica de estos cambios en la sensibilidad a la luz es diferente dependiendo de cuántas unidades de  $S_{tt}$  se acumulan y el tipo de tratamiento al que fueron expuestas las semillas (Fig. 4.1). Al final del proceso de estratificación ( $S_{tt} = 1500$  °Cd), la población mostró un bajo nivel de dormición y un incremento en la respuesta germinativa de las semillas para valores de Pfr/Pt 76% ( $G\% = 65\%$ ), mientras que para valores de Pfr/Pt de 3 y  $7.6 \times 10^{-4}\%$  los incrementos fueron relativamente menores ( $G\% = 25\%$  y  $24\%$ , respectivamente). Finalmente, para el tratamiento de oscuridad se obtuvo un porcentaje final de germinación de 15%.



**Figura 4.2** Porcentajes de germinación obtenidos a 15 °C en semillas de *P. aviculare* en respuesta a diferentes foto-equilibrios: Pfr/Pt: 76% (a); 3% (b);  $7.6 \times 10^{-4}\%$  (c); y para las semillas mantenidas en la oscuridad (d), en relación con el tiempo de inducción en dormición secundaria a las siguientes temperaturas: 10 °C (círculos); 15 °C (cuadrados); 20 °C (triángulos) y 25 °C (triángulos invertidos). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) y donde no se muestran barras, el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

La dinámica de los cambios en los porcentajes de germinación durante la inducción en dormición secundaria mostró una disminución en la sensibilidad a la luz en cada uno de los tratamientos (Pfr/Pt = 76, 3,  $7.6 \times 10^{-4}\%$  y oscuridad) durante los primeros días de inducción en dormición secundaria (0 – 6 días). No obstante, la dinámica de estos cambios en la sensibilidad a los distintos tratamientos lumínicos fue diferente dependiendo de la temperatura a la cual fueron expuestas las semillas durante la entrada en dormición secundaria (Fig. 4.2 a, b, c y d). Por ejemplo, cuando las semillas fueron expuestas a 25 °C la germinación se redujo de 65% a 33% para el día 1. Luego, al día 3, ésta se redujo de 33% a 16% y finalmente el día 7 se obtuvo un 2% de germinación (Fig.

4.2 a, b, c y d). Este comportamiento confirma que las semillas son muy sensibles a la exposición a altas temperaturas, incrementando rápidamente el nivel de dormición y, concomitantemente, disminuyendo la sensibilidad de las semillas a la luz. Un comportamiento similar se pudo observar para semillas expuestas a 20 °C. Sin embargo, en semillas expuestas a 10 y 15 °C el comportamiento fue algo diferente. Semillas expuestas a 10 °C mostraron una respuesta similar a la encontrada en el Capítulo 2: durante los primeros 11 días fueron lentamente inducidas en dormición secundaria; a partir de los 11 días y hasta los 26 el nivel de dormición no se vio modificado (i.e. 10 °C es una temperatura donde ambos procesos ocurren simultáneamente; salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria y el proceso dominante dependerá del nivel de dormición que presente la población de semillas y de la temperatura prevaleciente, ver Capítulo 2).

Finalmente, para semillas expuestas a 15 °C la velocidad de entrada en dormición secundaria fue intermedia entre la observada para las semillas expuestas a 10 y la detectada para semillas expuestas a 25 °C, debido a que, por encima de los 10 °C, el proceso de entrada en dormición secundaria predomina casi completamente por sobre el de salida de la dormición, pero ocurre a una tasa más lenta, como fue demostrado en el Capítulo 2. Estos resultados muestran que semillas expuestas a altas temperaturas (20 y 25 °C) son inducidas en dormición secundaria con una tasa mayor, lo que fue determinante para que la sensibilidad a la luz también haya disminuido rápidamente (Fig. 4.2 a, b). Contrariamente, para semillas expuestas a 10 y 15 °C, la tasa de inducción en dormición secundaria y, en forma concomitante, la pérdida de la sensibilidad a la luz, fue más lenta (Fig. 4.2 c, d).

#### 4.3.1.1 Desarrollo del modelo

Con el propósito de predecir qué porcentaje de la población del banco de semillas germinaría en los diferentes escenarios planteados anteriormente, se desarrolló un modelo que considera los cambios en la sensibilidad a la luz de la población de semillas en función de la temperatura experimentada durante la inducción en dormición secundaria en semillas de *P. aviculare*. Para ello, los porcentajes de germinación de semillas expuestas a las temperaturas que inducen en dormición secundaria (10, 15, 20 y 25 °C) y expuestas a los tratamientos lumínicos que establecen valores de Pfr/Pt de 76% (situación a), 3 y  $7.6 \times 10^{-4}$ % (situación b y c), y semillas dispuestas en oscuridad (situación c), fueron graficados en función del tiempo térmico de inducción en dormición secundaria ( $DI_{tt}$ ), previamente utilizado para predecir cambios en la temperatura del límite inferior ( $T_{l(50)}$ ) en el Capítulo 2 y predecir los cambios en la  $T_{l(50)}$  en función de la disponibilidad hídrica en el Capítulo 3. Los resultados obtenidos para cada situación (a, b y c), se pueden apreciar en la figura 4.3 (a, b y c).

En todas las situaciones (tratamientos lumínicos), se observó una adecuada correlación entre los cambios observados en la respuesta a los diferentes tratamientos para semillas expuestas a temperaturas que inducen en dormición secundaria, y la acumulación de  $DI_{tt}$ . La dinámica de los cambios en el porcentaje de germinación en función de la acumulación de  $DI_{tt}$ , pudo ser adecuadamente descrita ajustando modelos bi-lineales para las tres situaciones, donde se puede diferenciar una primera fase que disminuye linealmente a partir del máximo valor obtenido para una población con mínimo nivel de dormición, y luego una segunda fase de respuesta máxima para la entrada en dormición secundaria. Para semillas con un Pfr/Pt calculado de 76% (caso a), se determinó una fase inicial a partir de la cual se observó una disminución al estímulo lumínico a todas las temperaturas (Fig. 4.3 a). En la medida en que se acumulaban unidades de  $DI_{tt}$ , la fracción

de la población capaz de germinar fue menos sensible al estímulo lumínico, hasta un punto donde la población fue insensible ( $DI_{tt} = 103,6$  °Cd). Este mismo patrón de respuesta fue observado para las semillas expuestas a los tratamientos lumínicos 2, 3 y 4 (situaciones b, c y d), donde acumularon similares unidades térmicas en °Cd (i.e. situación b y c =  $103,7$  °Cd y situación d =  $100,9$  °Cd) para presentar valores nulos de germinación. La dinámica del porcentaje de germinación ( $G$ ) para semillas expuestas a las diferentes condiciones lumínicas en función de las unidades acumuladas de  $DI_{tt}$  fue descrita mediante los siguientes modelos bi-lineales:

(1) Pfr/Pt = 76%:

$$G\% = -0,48 \cdot (DI_{tt} - 103,6) \text{ si } (0 > DI_{tt} < 103,6) \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

$$G\% = 0 \text{ si } (DI_{tt} \Rightarrow 103,6) \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

(2) Pfr/Pt = 3% y  $7.6 \times 10^{-4}\%$ :

$$G\% = -0,19 \cdot (DI_{tt} - 103,7) \text{ si } (0 > DI_{tt} < 103,7) \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

$$G\% = 0 \text{ si } (DI_{tt} \Rightarrow 103,7) \quad (\text{Ecuación 4.6})$$

(3) Oscuridad:

$$G\% = -0,12 \cdot (DI_{tt} - 100,9) \text{ si } (0 > DI_{tt} < 100,9) \quad (\text{Ecuación 4.7})$$

$$G\% = 0 \text{ si } (DI_{tt} \Rightarrow 100,9) \quad (\text{Ecuación 4.8})$$

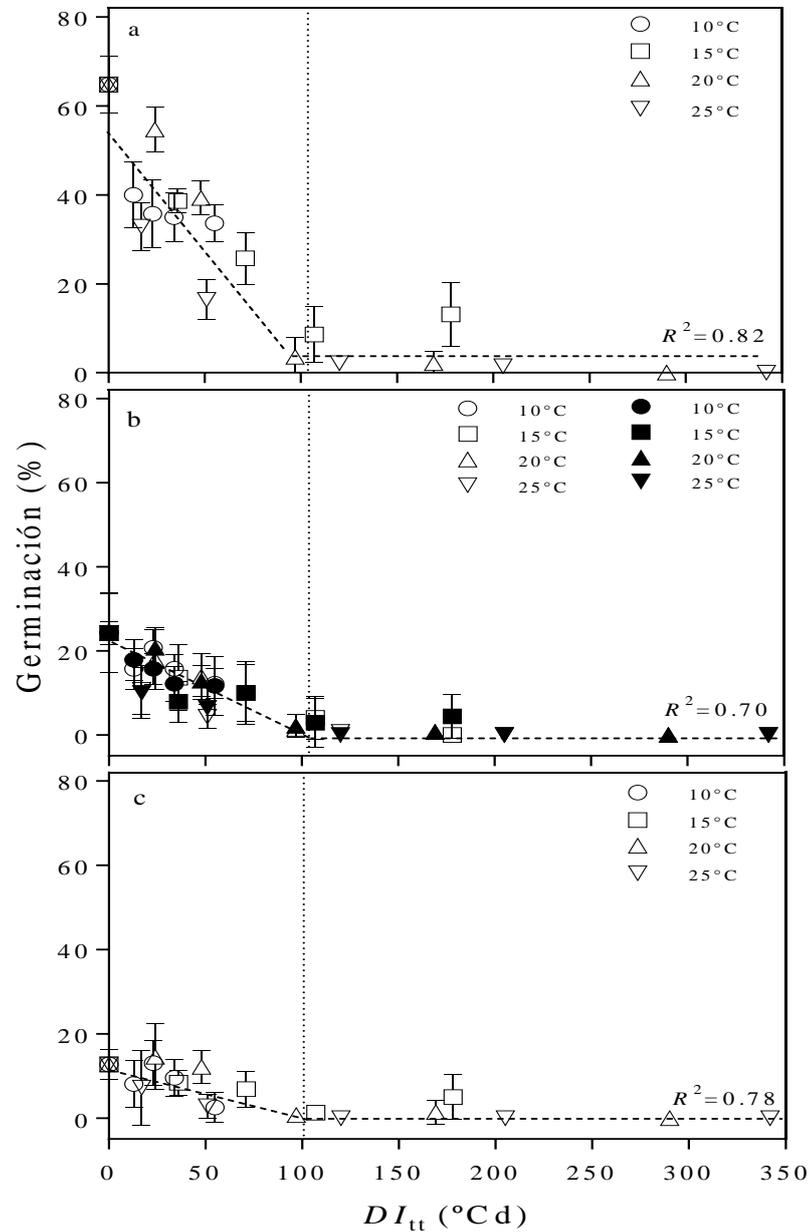
Para semillas con Pfr/Pt calculados de 3 y  $7.6 \times 10^{-4}\%$  se observó una dinámica similar de cambios en el porcentaje de germinación. En todos los tratamientos las semillas acumularon valores similares de  $DI_{tt}$  ((1) =  $103,6$  °Cd, (2 y 3) =  $103,7$  y (4) =  $100,9$ ) indicando que alrededor de esos valores se completa el proceso de entrada en dormición secundaria.

#### 4.3.1.2 Evaluación del modelo

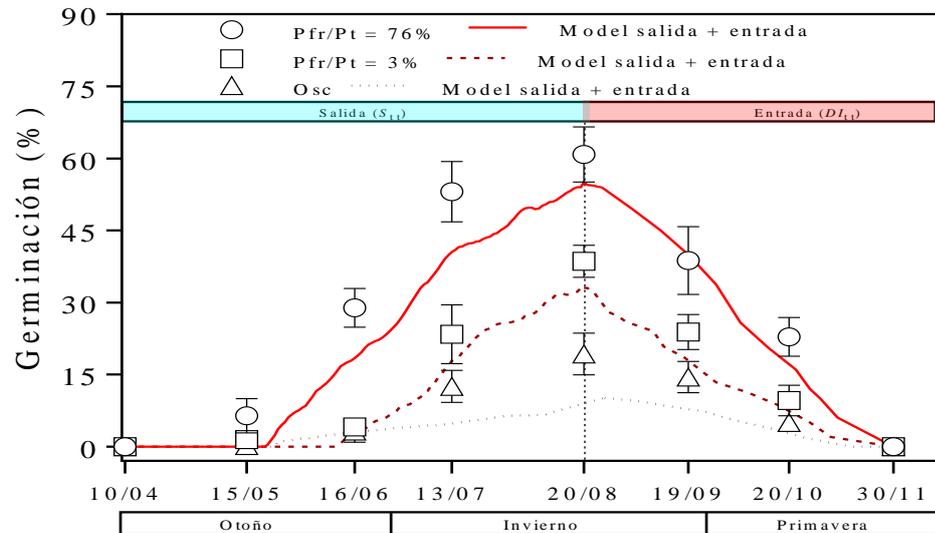
La performance del modelo que predice los cambios en la sensibilidad a la luz durante la inducción en dormición secundaria se evaluó con datos independientes obtenidos a campo (abril – noviembre, 2016). Estos cambios en la sensibilidad a la luz fueron estimados de acuerdo a los °Cd acumulados en función de la temperatura del suelo, dependiendo de cuál modelo acumuló más °Cd ( $S_{tt}$  o  $DI_{tt}$ ). Los cambios en la sensibilidad a la luz durante la salida de la dormición primaria estuvieron asociados con la acumulación de  $S_{tt}$ , cada vez que la temperatura media diaria registrada a 5 cm de profundidad se encontró por debajo de  $17$  °C (Batlla y Benech-Arnold, 2003). En cambio, durante la inducción en dormición secundaria estuvieron asociados con la acumulación de  $DI_{tt}$  cada vez que la temperatura media diaria registrada a 5 cm de profundidad se encontró por encima de  $7,9$  °C (Capítulo 2).

El modelo mostró una adecuada descripción de los cambios en la sensibilidad a la luz de la población de semillas en función de la acumulación de  $S_{tt}$  y  $DI_{tt}$  según la temperatura que experimentaron las semillas enterradas en el suelo (ecuaciones 4.1, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7 y 4.8), simulando adecuadamente cómo las diferentes fracciones de la población responden al LFR, al VLFR, y a la oscuridad durante la salida y entrada en dormición secundaria. Por otro lado, el modelo también fue capaz de predecir adecuadamente el momento en el cual las semillas adquirieron los diferentes tipos de respuestas en relación con la acumulación de  $S_{tt}$  durante la salida de la dormición primaria (modelo desarrollado por Batlla y Benech-Arnold, 2005) y la acumulación de  $DI_{tt}$  (índice propuesto en el Capítulo 2). Sin embargo, los modelos subestimaron levemente el porcentaje de la población que presentó respuestas del tipo VLFR y germinación en oscuridad para semillas exhumadas alrededor del 20/08/16. En general, los modelos

lograron simular adecuadamente la fracción de la población capaz de germinar en cada una de las condiciones en función de la temperatura que experimentaron las semillas enterradas en el suelo (Fig. 4.4).



**Figura 4.3** Porcentaje de germinación para semillas de *P. aviculare* en relación con el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) (índice desarrollado en el Capítulo 2) para semillas expuestas a 10 °C (círculos), 15 °C (cuadrados), 20 °C (triángulos) y 25 °C (triángulos invertidos) en respuesta a diferentes tratamientos de luz: (a) tratamiento 1: Pfr/Pt = 76%; (b) tratamiento 2: Pfr/Pt = 3% (símbolos abiertos) y tratamiento 3: Pfr/Pt =  $7.6 \times 10^{-4}$ % (símbolos cerrados) y (c) tratamiento 4: Semillas mantenidas en la oscuridad. Las líneas continuas en los paneles (a – c) corresponden al ajuste de los modelos bi-lineales con  $R^2 = 0,82, 0,70$  y  $0,78$ , respectivamente. Las líneas punteadas verticales indican que por encima de los  $DI_{tt} = 100$  °Cd, no hay más entrada en dormición (dormición absoluta). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) y donde no se muestran barras, el valor del SE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

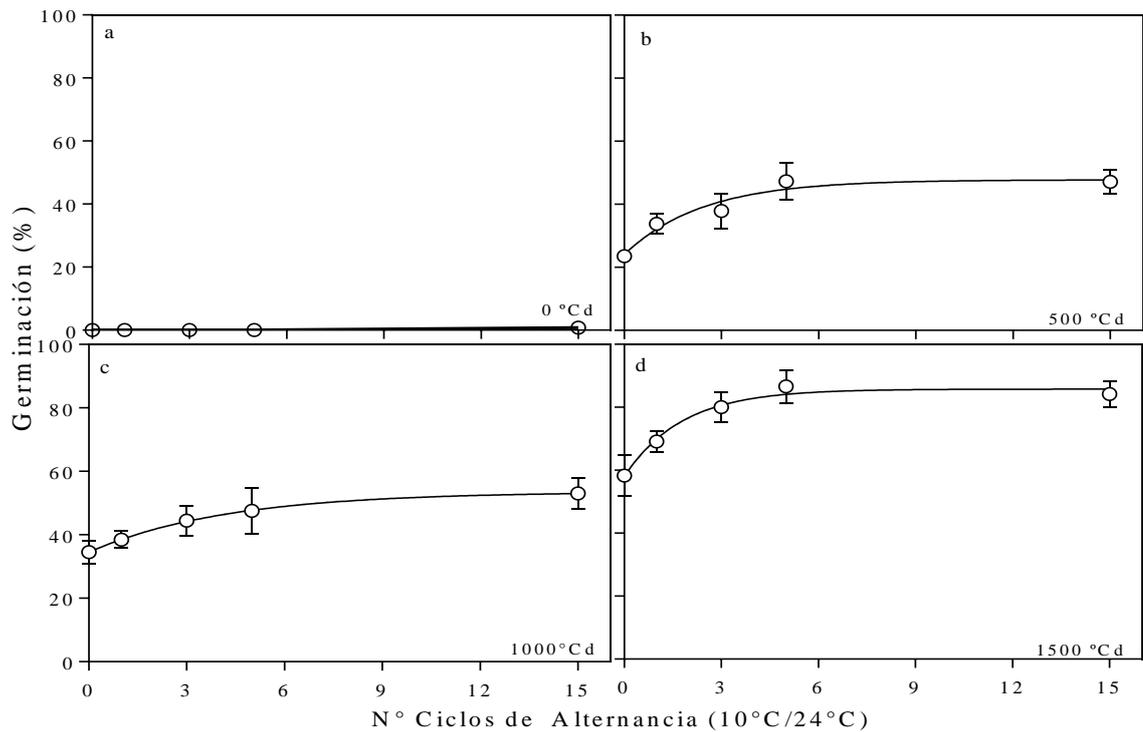


**Figura 4.4** Porcentajes de germinación observados y simulados para semillas de *P. aviculare* en función de la acumulación de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) durante la salida de la dormición primaria (modelo desarrollado por Batlla y Benech-Arnold, 2005) y tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) durante la entrada en dormición secundaria (índice desarrollado en el Capítulo 2) para semillas enterradas en el suelo. La línea punteada vertical indica fin de salida/inicio de entrada en dormición. Los símbolos representan los porcentajes de germinación observados para semillas enterradas en el campo (otoño, invierno y principios de primavera) expuestas a los siguientes tratamientos: (1) Pfr/Pt = 76% (círculos); (2) Pfr/Pt = 3% (cuadrados) y (3) semillas mantenidas en la oscuridad (triángulos). La línea roja llena representa la germinación predicha por la simulación para valores de Pfr/Pt de 76%, 3% (línea punteada) y oscuridad (línea punteada negra) en función de las unidades térmicas acumuladas para  $S_{tt}$  y  $DI_{tt}$ . Los porcentajes de germinación predichos fueron simulados utilizando las ecuaciones (4.1, 4.3 – 4.8), en función de la temperatura experimentada por las semillas en el campo. Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) y donde no se muestran barras, el SE de la media es menor que el tamaño del símbolo.

#### 4.3.2 Cambios en la sensibilidad a las temperaturas alternadas durante la salida y entrada en dormición secundaria

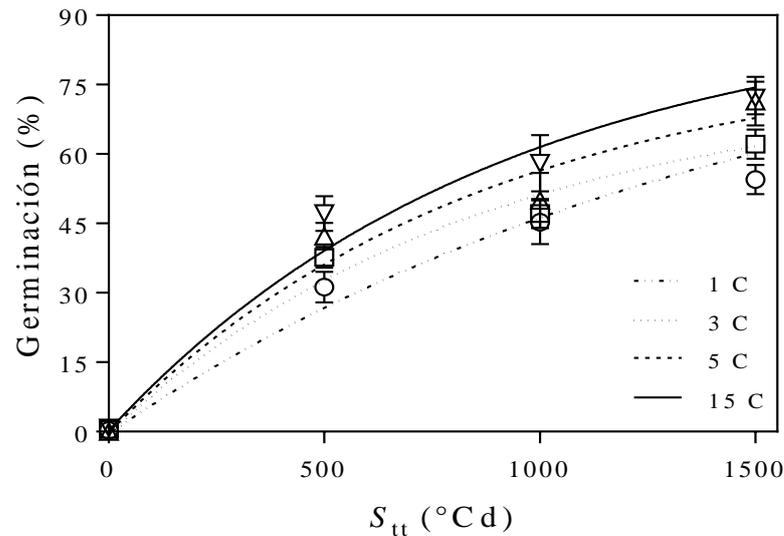
Al inicio de los experimentos, las semillas recién dispersadas fueron expuestas a diferente número de ciclos (0, 1, 3, 5 y 15 ciclos) de temperaturas alternadas (10/24 °C de 12/12 hs) para verificar el nivel de dormición inicial de la población. Los resultados mostraron valores de germinación muy bajos (germinación observada <2%), lo cual indicó una muy baja o casi nula sensibilidad de la población de semillas recién dispersadas al efecto de las temperaturas fluctuantes (semillas con un alto nivel de dormición) (Fig. 4.5 a).

La respuesta en términos de porcentajes de germinación para la población de semillas de *P. aviculare* en relación al número de ciclos de temperaturas fluctuantes aumentó a medida que las semillas salían de la dormición. La fracción de la población de semillas capaz de germinar a temperatura constante (15 °C) también aumentó, y se observó una progresiva disminución en el número de ciclos de temperaturas fluctuantes requeridos para saturar la respuesta germinativa de la población de semillas (Fig. 4.5 b, c y d). Al final del período de estratificación ( $\approx 1500$  °Cd), se obtuvieron altos porcentajes de germinación a una temperatura de 15 °C constante y el efecto de los ciclos sobre la respuesta germinativa fue mínima (Fig. 4.5).



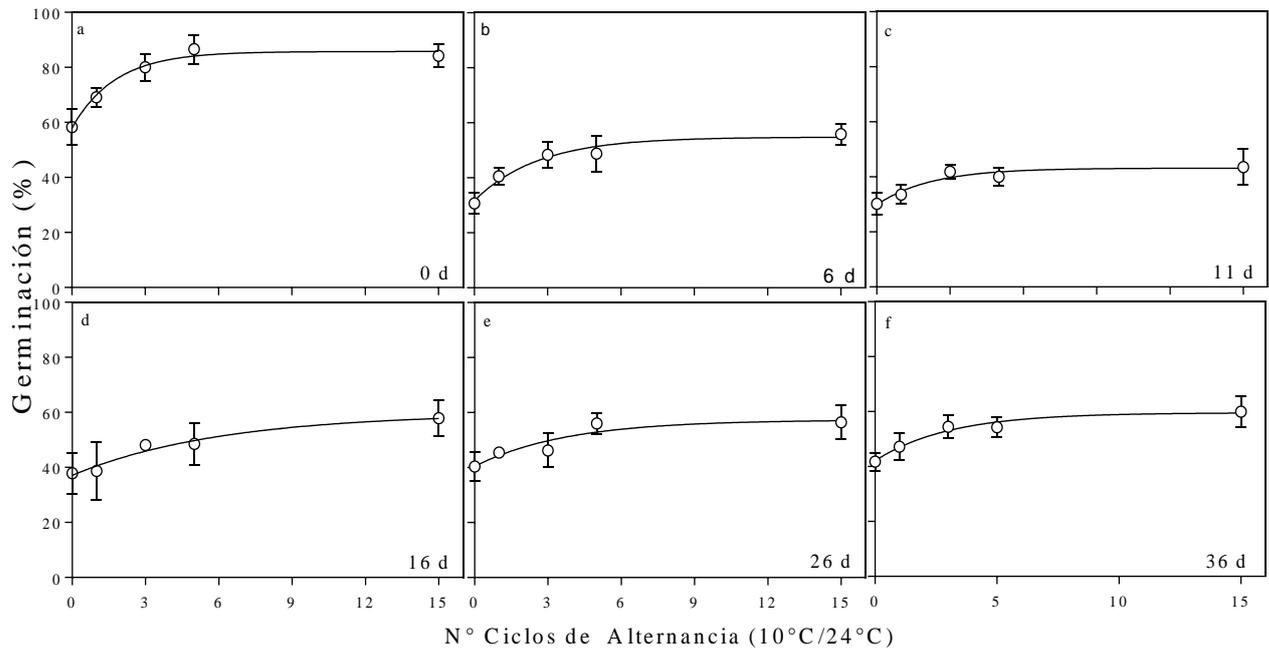
**Figura 4.5** Curvas de respuesta de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas durante diferentes tiempos de  $S_{tt}$  ((a) 0, (b) 500, (c) 1000 y (d) 1500 °Cd) estratificadas a 5 °C (Batlla y Benech-Arnold, 2003). Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo.

La dinámica de los cambios en los porcentajes de germinación obtenidos en cada tratamiento de ciclos de temperaturas alternadas en función de la acumulación de  $S_{tt}$  (500, 1000 y 1500 °Cd) a 5 °C, pudo ser adecuadamente descrita utilizando el modelo desarrollado por Batlla et al. (2003), como se muestra en la figura (4.6). Los porcentajes de germinación simulados para cada tiempo de  $S_{tt}$  fueron adecuadamente descriptos por el modelo, lo que permitió calcular la fracción de la población capaz de germinar en respuesta a la exposición a un número creciente de ciclos de temperaturas alternadas (Fig. 4.6). A medida que las semillas acumulaban  $S_{tt}$ , se requirieron menos ciclos de temperaturas fluctuantes para obtener máximos porcentajes finales de germinación (Fig. 4.5 b, c y d).



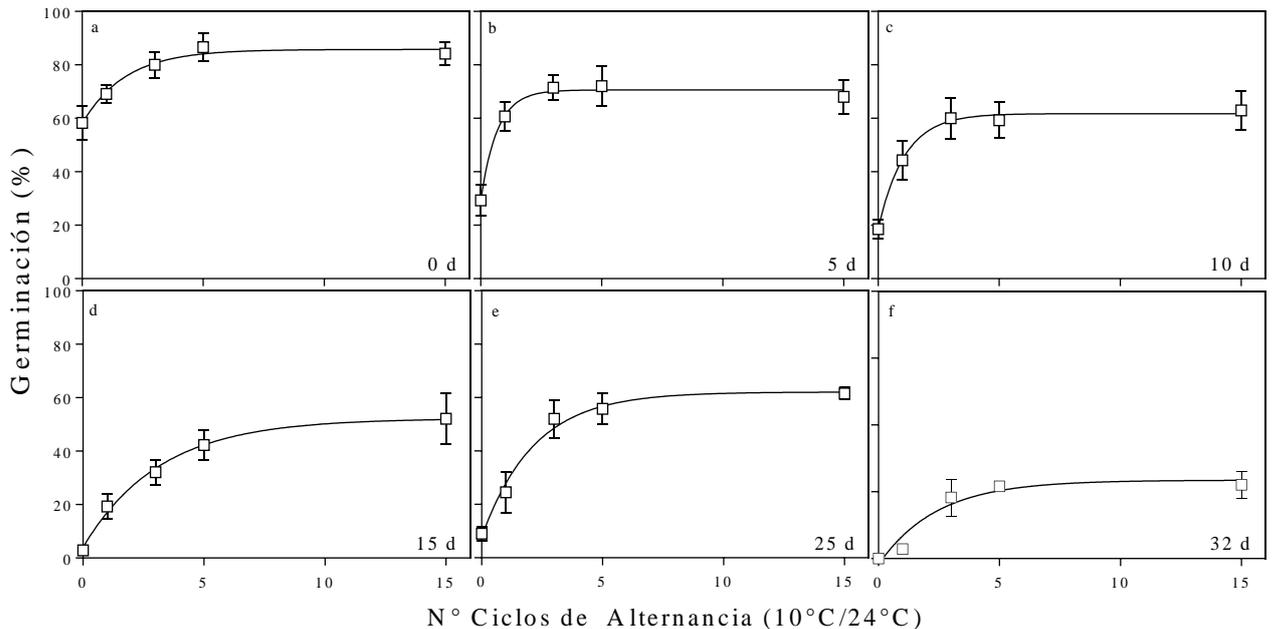
**Figura 4.6** Porcentajes de germinación simulados predichos (líneas) y observados (símbolos vacíos) de semillas de *P. aviculare* expuestas a 0, 1, 3, 5 y 15 ciclos de 10/24 °C (12/12 hs) en relación al tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) acumulado durante la salida de la dormición primaria. Los datos corresponden a semillas estratificadas a 5 °C en condiciones controladas. Los porcentajes de germinación fueron simulados utilizando las ecuaciones derivadas por Batlla et al. (2003) en relación a los valores acumulados de  $S_{tt}$ . Las líneas corresponden a la ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ , ajustada a los datos simulados (símbolos llenos) ( $R^2 = 0,85$ ), cada línea corresponde un número de ciclos (1 ciclo = línea continua - punteada, 3 ciclos = línea punteada, 5 ciclos = línea continua y 15 ciclos = línea llena).  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) de los datos obtenidos en forma experimental. En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo.

La dinámica de las modificaciones en los porcentajes de germinación en relación al número de ciclos de temperaturas alternadas cambió de dirección cuando las semillas fueron inducidas en dormición secundaria. Esta dinámica fue diferente dependiendo de la temperatura de inducción a la cual fueron expuestas las semillas (i.e 10, 15, 20 y 25 °C). Como resultado de la exposición a estas temperaturas se vio afectado el tamaño de la fracción de semillas capaz de germinar a temperaturas constantes (15 °C) y la sensibilidad a las temperaturas alternadas: las semillas requirieron cada vez más ciclos para saturar la respuesta germinativa a medida que el nivel de dormición se incrementó (Figs. 4.7 - 4.10). Por ejemplo, cuando las semillas fueron expuestas a 25 °C, los porcentajes de germinación a temperatura constante (15 °C) disminuyeron de 58% (día 0 de inducción) a 46% (día 3 de inducción) y para el día 7 alcanzó a germinar solo un 7%; a partir del día 7 y hasta el día 16, la germinación fue 0% (Fig. 4.10 a, b, c, d, e y f). Simultáneamente, el requerimiento de ciclos de temperatura fluctuante aumentó gradualmente a medida que las semillas eran inducidas en dormición secundaria hasta los 7 días, mostrando mayores porcentajes de germinación a mayor número de ciclos (i.e. a 3, 5 y 15 ciclos) (Fig. 4.10 a, b, c y d). Después de los 7 días de exposición y hasta los 16 días, la sensibilidad a las temperaturas alternadas disminuyó casi por completo (sin cambios en el porcentaje de germinación ante el aumento de los ciclos) (Fig. 4.10 e, f).



**Figura 4.7** Curvas de respuesta de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas luego de diferentes días durante la inducción en dormición secundaria a una temperatura de 10 °C: a = 0 días, b = 6 días, c = 11 días, d = 16 días, e = 26 días y f = 36 días. Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C, previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo.

Cuando las semillas fueron expuestas a 20 °C, mostraron una respuesta similar a las semillas expuestas a 25 °C; donde primero se vio afectada la proporción de semillas capaz de germinar a 15 °C, y luego, se vio afectada la sensibilidad a las temperaturas alternadas (Fig. 4.9). Esta sensibilidad fue disminuyendo a medida que las semillas permanecían más tiempo a 20 °C. En efecto, se necesitaron cada vez más ciclos de temperatura alternada para saturar la respuesta germinativa. Por ejemplo, durante los primeros 8 días disminuyó completamente la germinación a temperatura constante (58% - 0%); sin embargo, la disminución en los ciclos de temperatura alternada fue gradual. Primero se vio afectada la respuesta germinativa a 1 ciclo, luego a 3 y 5 ciclos, y finalmente a 15 ciclos (Fig. 4.9 a, b, c y d). A partir de los 8 días y hasta los 20 días, la población de semillas mostró una respuesta mínima a todos los ciclos de temperatura alternada. Esto se puede ver en los porcentajes de germinación final, ya que germinó lo mismo con 3 ciclos que con 15 ciclos de temperaturas alternadas (Fig. 4.9 e y f). Por lo tanto, dado que cualquier dosis de ciclos dio como resultado porcentajes de germinación similares, se puede sugerir que el efecto de acumular ciclos de temperatura alternada desaparece a medida que el nivel de dormición aumenta.

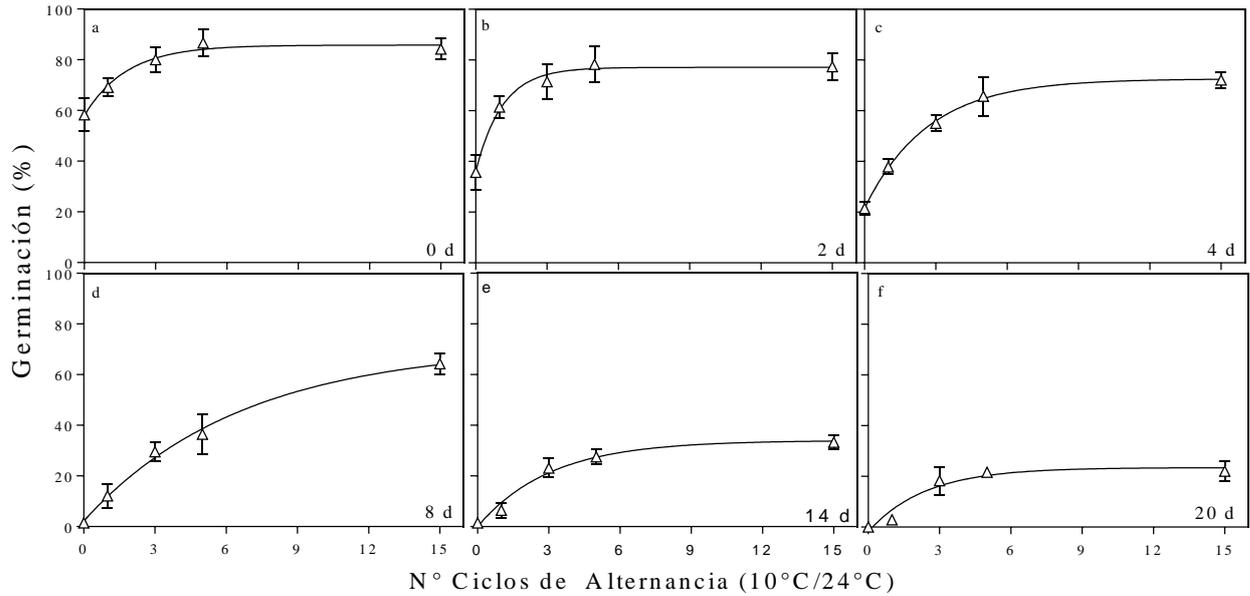


**Figura 4.8** Curvas de respuesta de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas luego de diferentes días durante la inducción en dormición secundaria a una temperatura de 15 °C: a = 0 días, b = 5 días, c = 10 días, d = 15 días, e = 25 días y 32 días. Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo.

Las semillas que fueron expuestas a 10 °C, mostraron un comportamiento similar al encontrado en el Capítulo 2 durante la inducción en dormición secundaria, que también fuera descrito para el caso de la sensibilidad a la luz en este mismo Capítulo. La población de semillas con bajo nivel de dormición primero fue inducida en dormición secundaria; sin embargo, cuando el nivel de dormición aumentó, 10 °C promovió la salida de la dormición primaria. La dirección que toma la respuesta a la exposición a esta temperatura, según se comentó en el Capítulo 2, parecería estar determinada por el nivel de dormición de la población de semillas y la temperatura a la que estén expuestas las semillas (p.ej. si esa temperatura está más o menos alejada del umbral de 17 °C para salida de la dormición).

La inducción en dormición secundaria tuvo lugar durante los primeros 11 días; después de este período y hasta los 26 días el proceso predominante fue la salida de la dormición. La respuesta observada durante la inducción en dormición fue diferente de aquella observada en 20 y 25 °C, (mayor tasa de inducción en dormición secundaria) donde la fracción capaz de germinar a temperatura constante se vio levemente afectada (60% día 0 – 30% día 11), como así también la sensibilidad a los ciclos de temperatura alternada (saturándose la respuesta germinativa con el mínimo número de ciclos) (Fig. 4.7 a, b, c). A partir de los 11 días y hasta los 26 días, las semillas mostraron incrementos

en los porcentajes de germinación, tanto a temperatura constante (30% 11 días – 42% 36 días) como en respuesta al aumento en el número de ciclos de temperatura alternada (15 ciclos = 60% al día 36) (Fig. 4.7 c, d, e). Finalmente, las semillas que fueron expuestas a 15 °C mostraron un patrón de entrada en dormición secundaria más evidente, reduciéndose los porcentajes de germinación a 15 °C a medida que aumentó el tiempo de exposición de las semillas, e incrementándose los requerimientos en términos de número de ciclos de temperaturas alternadas para alcanzar la saturación de la respuesta (Fig. 4.8 a, b, c, d, e y f).

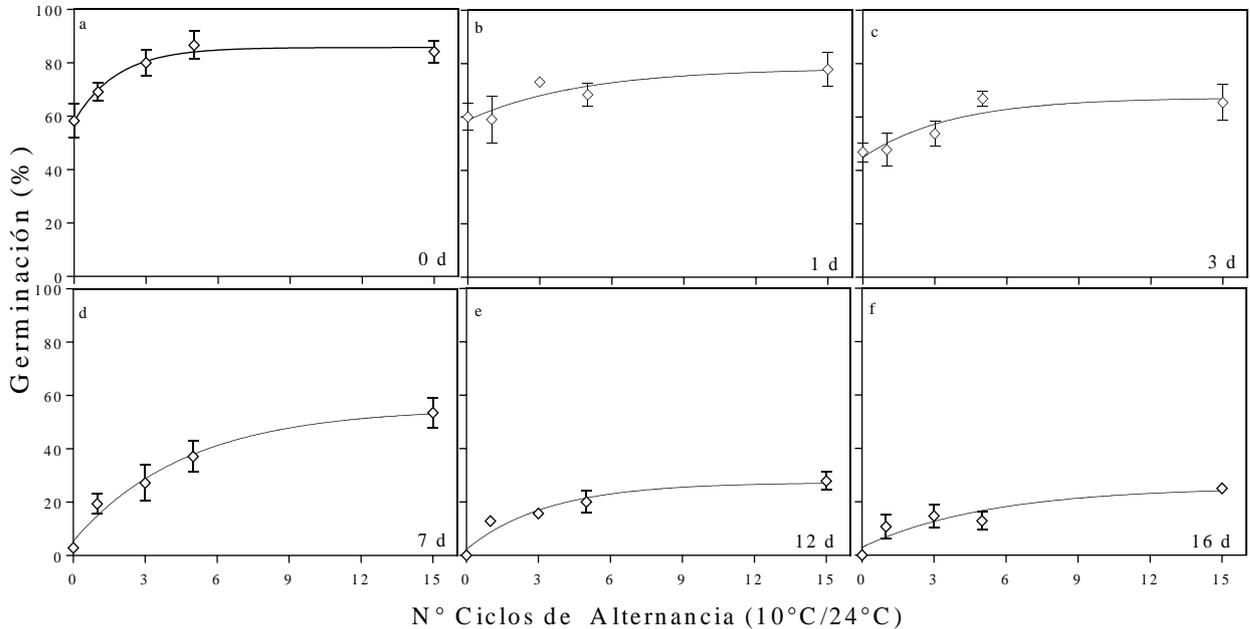


**Figura 4.9** Curvas de respuesta de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas luego de diferentes días durante la inducción en dormición secundaria a una temperatura de 20 °C: a = 0 días, b = 2 días, c = 4 días, d = 8 días, e = 14 días y f = 20 días. Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Plateau, es el valor Y en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que Y. K, es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X. C, es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores Y. X, es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo.

#### 4.3.2.1 Desarrollo del Modelo

Se desarrolló un modelo matemático para predecir los cambios en la fracción de la población de semillas que podría germinar en respuesta a un número determinado de ciclos de 10/24 °C (12/12 hs) en relación a la acumulación de unidades de tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Para ello, se utilizaron las respuestas de germinación obtenidas para semillas exhumadas durante la exposición a diferentes temperaturas de inducción en dormición secundaria (10, 15, 20 y 25 °C). A partir del ajuste de cada curva de germinación (ecuación 4.2) obtenida como resultado de la exposición a las diferentes temperaturas de inducción y en diferentes momentos durante el proceso de entrada en dormición secundaria, se derivaron los valores de C y K (C es la diferencia entre el

porcentaje de germinación obtenido con 0 ciclos (i.e. 15 °C constante y  $N$  ciclos, y  $K$  es el efecto del número de ciclos ( $N$ )) como parámetros para el desarrollo del modelo (Fig. 4.11).



**Figura 4.10** Curvas de respuesta de la germinación de semillas de *P. aviculare* a un número creciente de ciclos de un régimen fluctuante de temperatura de 10/24 °C (12/12 hs). Los paneles corresponden a semillas exhumadas luego de diferentes días durante la inducción en dormición secundaria a una temperatura de 25 °C: a = 0 días, b = 1 días, c = 3 días, d = 7 días, e = 12 días y f = 16 días. Las semillas exhumadas fueron expuestas a 0, 1, 3, 5 o 15 ciclos de 10/24 °C previo a ser incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. 0 ciclos corresponde a semillas incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Las líneas llenas corresponden al ajuste de la siguiente ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ .  $Y_0$ , es el valor  $Y$  cuando  $X$  (tiempo) es cero. Plateau, es el valor  $Y$  en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que  $Y$ .  $K$ , es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje  $X$ .  $C$ , es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores  $Y$ .  $X$ , es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ). En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo.

Con el objetivo de predecir los cambios en la respuesta germinativa al número de ciclos de 10/24°C en relación a los cambios en el nivel de dormición de las semillas, los parámetros de las curvas de respuesta  $C$  y  $K$  para cada valor de  $DI_{tt}$  fueron relacionados a la acumulación de  $DI_{tt}$ . Los cambios en  $C$  fueron adecuadamente descriptos por el siguiente modelo bilineal:

$$C = 16,62 + 0,368 \cdot DI_{tt}, \text{ si } (DI_{tt} \leq 103,1) \quad \text{Ecuación (4.9)}$$

$$C = 48,6 - 0,124 \cdot (DI_{tt} - 103,1), \text{ si } (DI_{tt} > 103,1) \quad \text{Ecuación (4.10)}$$

Los cambios en  $K$  fueron descriptos por el siguiente modelo bilineal:

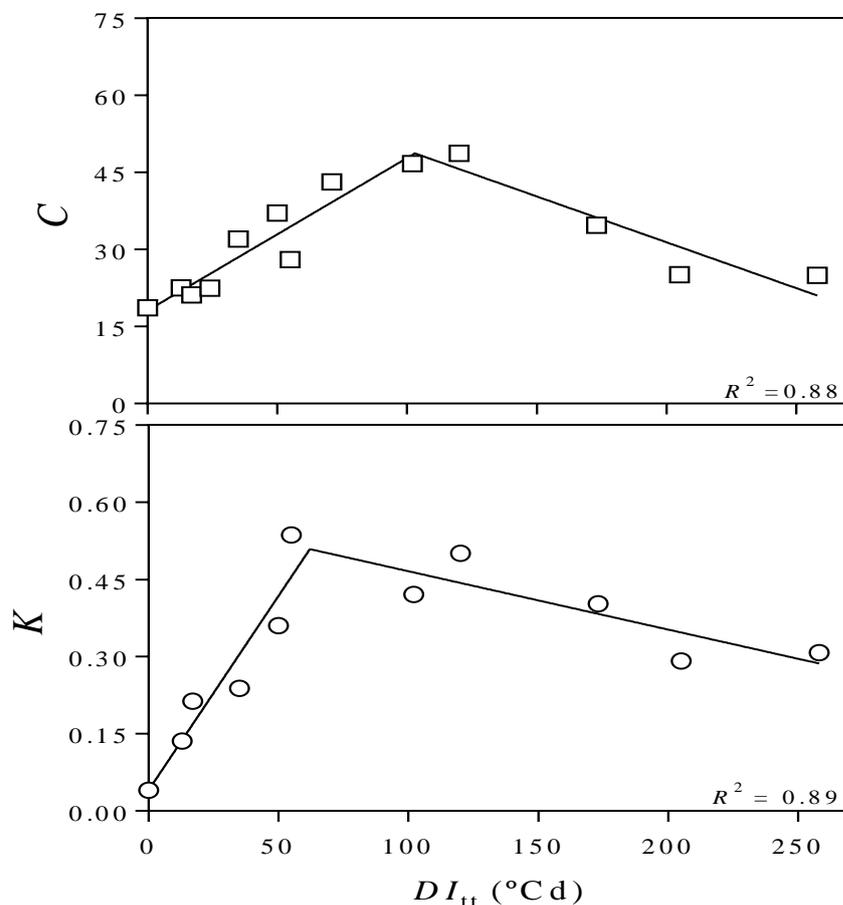
$$K = 0,040 + 0,0075 \cdot DI_{tt}, \text{ si } (DI_{tt} \leq 62) \quad \text{Ecuación (4.11)}$$

$$K = 0,51 - 0,0011 \cdot (DI_{tt} - 62), \text{ si } (DI_{tt} > 62) \quad \text{Ecuación (4.12)}$$

La relación obtenida entre  $C$ ,  $K$  y  $DI_{tt}$  permitió estimar la respuesta germinativa como resultado de la exposición a un determinado número de ciclos de 10/24 °C en relación a las unidades de  $DI_{tt}$  acumuladas (usando las ecuaciones 4.1 y 4.2) durante la inducción en dormición secundaria para semillas de *P. aviculare*.

#### 4.3.2.2 Evaluación del modelo

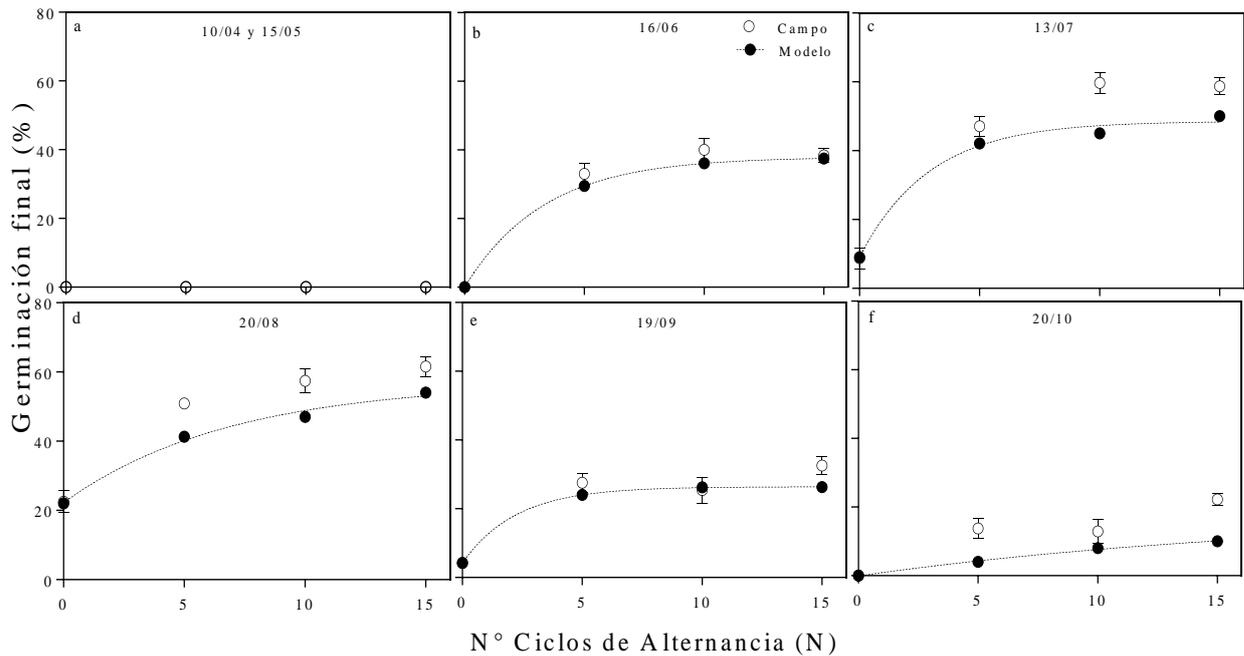
El modelo fue evaluado utilizando datos de un experimento a campo y de un experimento independiente en condiciones controladas, los cuales fueron descritos en la sección de “*Materiales y Métodos*”. Para contrastar las predicciones derivadas por el modelo contra los datos obtenidos en cada una de las exhumaciones en el experimento a campo, los valores de  $C$  y  $K$  fueron simulados utilizando las ecuaciones (4.2, 4.9 - 4.12) en relación a la temperatura media diaria registrada a 5 cm de profundidad.



**Figura 4.11** Dinámica de los coeficientes  $C$  y  $K$  en relación al tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Los valores de  $C$  y  $K$  corresponden a las curvas de respuesta de la germinación ( $Y_X = C \cdot (1 - \exp(K \cdot X)) + Y_0$ ) de semillas de *P. aviculare* al número de ciclos de un régimen de temperatura fluctuante de 10/24 °C (12/12 hs) determinadas para diferentes valores de  $DI_{tt}$ . Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los siguientes modelos bilineales:  $C = 16,62 + 0,368 \cdot DI_{tt}$ , si ( $DI_{tt} \leq 103,1$ );  $C = 48,6 - 0,124 \cdot (DI_{tt} - 103,1)$ , si ( $DI_{tt} > 103,1$ ), y  $K = 0,040 + 0,0075 \cdot DI_{tt}$ , si ( $DI_{tt} \leq 62$ );  $K = 0,51 - 0,0011 \cdot (DI_{tt} - 62)$ , si ( $DI_{tt} > 62$ ).

Finalmente, para predecir la fracción de la población de semillas que debería germinar luego de la exposición a 0, 5, 10 y 15 ciclos de 10/24 °C, los valores calculados de  $C$  y  $K$  correspondientes a cada fecha de exhumación (abril – noviembre, 2016) fueron

reemplazados en la ecuación (4.2) de acuerdo a los valores acumulados de  $S_{tt}$  y  $DI_{tt}$  para cada fecha de exhumación teniendo en cuenta el período de incubación a 15 °C. Los valores de  $G_0$  utilizados correspondieron a los porcentajes de germinación registrados luego de 15 días de incubación a una temperatura constante de 15 °C. Los datos simulados lograron predecir razonablemente la respuesta de la fracción de la población de semillas que germinaría al ser expuesta a un número determinado de ciclos de fluctuaciones de temperatura (Fig. 4.12). El modelo subestimó levemente los valores predichos para las exhumaciones realizadas entre el 13/07/16 y 20/08/16 (Fig.4.12 c, d) durante la salida de la dormición primaria, mientras que durante la inducción en dormición secundaria los valores predichos se ajustaron adecuadamente a los valores observados (Fig. 4.12 e, f).



**Figura 4.12** Porcentajes de germinación simulados (símbolos llenos) y observados (símbolos vacíos) de semillas de *P. aviculare* expuestas a 0, 5, 10 y 15 ciclos de 10/24 °C (12/12 hs) en relación al tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) acumulado durante la salida e inducción en dormición secundaria. Los datos corresponden a semillas enterradas en el campo (círculos vacíos) y porcentajes de germinación predichos por los modelos (círculos llenos). Previamente a ser expuestas a los diferentes ciclos de 10/24 °C, las semillas fueron incubadas por 15 días a una temperatura constante de 15 °C. Los paneles (a, b, c y d) corresponden a la salida de la dormición primaria y los paneles (e y f) a la entrada en dormición secundaria. Los porcentajes de germinación fueron simulados utilizando las ecuaciones (4.3, 4.9 - 4.12) en relación a los valores acumulados de  $S_{tt}$  y  $DI_{tt}$  calculados utilizando la ecuación (4.9). La línea punteada corresponde a la ecuación:  $Y_X = C \cdot (1 - \exp(-K \cdot X)) + Y_0$ , ajustada a los datos simulados (símbolos llenos) ( $RMSE = 3,1$  (b),  $RMSE = 10,3$  (c),  $RMSE = 9,3$  (d),  $RMSE = 4,2$  (e),  $RMSE = 9,5$  (f), respectivamente).  $Y_0$ , es el valor  $Y$  cuando  $X$  (tiempo) es cero. Plateau, es el valor  $Y$  en infinitos momentos, expresado en las mismas unidades que  $Y$ .  $K$ , es la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje  $X$ .  $C$ , es la diferencia entre  $Y_0$  y Plateau, expresada en las mismas unidades que sus valores  $Y$ .  $X$ , es el tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $\pm SE$ ) de los datos obtenidos en forma experimental. En los casos donde no se observa la barra de error es porque el SE es menor que el símbolo.

#### 4.4 Discusión

Para las semillas de muchas especies no es suficiente alcanzar un bajo nivel de dormición para germinar, sino que las mismas requieren primero de la exposición a ciertos factores ambientales que actúan como terminadores de la dormición (i.e. luz y

temperaturas alternadas) (Benech-Arnold et al., 1990a; Scopel et al., 1991; Ghera et al., 1992; Ghera et al., 1997). Por esa razón, las variaciones en el nivel de dormición no sólo deberían expresarse como cambios en la amplitud del rango de temperaturas permisivas para la germinación, sino que también como cambios en la sensibilidad a los efectos de estos factores terminadores de la dormición (Benech-Arnold et al., 2000). Por lo tanto, si se pretende construir modelos capaces de predecir la emergencia de malezas, es necesario considerar el efecto de los factores terminadores de la dormición y la forma en que este efecto se ve modificado por los cambios en el nivel de dormición de las poblaciones de semillas (Forcella et al., 2000; Grundy, 2003; Batlla y Benech-Arnold, 2010).

Para estudiar los cambios en la sensibilidad a la luz y a las temperaturas alternadas en semillas de *P. aviculare* durante la inducción en dormición secundaria, se utilizaron semillas que habían salido de la dormición primaria a través de la estratificación a 5 °C. La salida de la dormición se caracterizó por un aumento en la sensibilidad a la luz y a las temperaturas alternadas (Fig. 4.1; 4.5 y 4.6), como se había observado para *P. aviculare* (Batlla y Benech-Arnold, 2004; Batlla et al., 2003) y otras especies de comportamiento primavero-estival (Probert, 2000; Baskin y Baskin, 1990; Bauer et al., 1998; Meyer et al., 2000; Alvarado y Bradford, 2005). Durante la inducción en dormición secundaria ocurrió lo opuesto. La sensibilidad que presentaron las semillas a la luz y a las temperaturas alternadas cuando el nivel de dormición fue mínimo, disminuyó rápidamente durante la inducción en dormición secundaria (Fig. 4.2 y 4.7 - 4.10). La velocidad con la que ocurre esta disminución en la sensibilidad fue dependiente de la temperatura a la cual las semillas fueron inducidas en dormición secundaria: cuando las semillas de *P. aviculare* se expusieron a altas temperaturas (20 y 25 °C), las mismas fueron inducidas en dormición secundaria a una tasa mayor que cuando fueron expuestas a 10 y 15 °C. La misma relación entre la temperatura y la tasa de inducción en dormición secundaria fue verificada en los Capítulos anteriores, donde la inducción en dormición secundaria fue evaluada a través de cambios en el rango térmico permisivo para la germinación de las semillas (Capítulo 2 y Capítulo 3).

En el presente Capítulo se desarrollaron dos modelos que permiten simular los cambios en la sensibilidad a la luz (1) y los cambios en la sensibilidad a las temperaturas alternadas (2) en semillas de *P. aviculare* en función de la temperatura experimentada durante el período de entierro en el suelo (Fig. 4.3 y 4.11). El primer modelo (1) predice la proporción de la población que germinará cuando las semillas estén expuestas a condiciones lumínicas que imponen diferentes porcentajes de Pfr/Pt (76, 3 y  $7.6 \times 10^{-4}\%$ ), y las semillas que germinarán en ausencia de luz (oscuridad) durante la inducción en dormición secundaria (Fig. 4.3). Como fue mencionado en la introducción, estos porcentajes de Pfr/Pt se corresponden con los diferentes modos de acción del fitocromo VLFR y LFR (76% Pfr/Pt) y VLFR (3 y  $7.6 \times 10^{-4}\%$  Pfr/Pt) a los que pueden responder las semillas en condiciones naturales (Cone et al., 1985; Vertucci et al., 1987). Es importante destacar, que el Pfr por sí solo no termina con la dormición. Por el contrario, el Pfr establece una cascada de eventos que culminan en la terminación de la dormición, manifestada mediante la germinación de la semilla (Bewley y Black, 1994).

El efecto de la temperatura de estratificación (5 °C) sobre los cambios en la sensibilidad a la luz en semillas de *P. aviculare* pudo ser descrito utilizando el parámetro tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) introducido por Batlla y Benech-Arnold (2003), que permitió predecir adecuadamente los cambios en la sensibilidad a la luz durante la salida de la dormición primaria en relación con la temperatura de estratificación como ya había sido demostrado por Batlla y Benech-Arnold (2005) (Fig. 4.1). En cambio, el efecto de las temperaturas de inducción en dormición secundaria (10 - 25 °C) sobre los cambios

en la sensibilidad a la luz pudo ser descripto utilizando el parámetro tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) desarrollado en el Capítulo 2 (Fig. 4.3), el cual permitió predecir los cambios en la sensibilidad a la luz durante la inducción en dormición secundaria. Estos parámetros permitieron predecir la fracción de la población capaz de germinar dependiendo de los valores de  $P_{fr}/P_t$  (76, 3 y  $7.6 \times 10^{-4}\%$ ) alcanzados por las semillas enterradas en el suelo. Algunos resultados similares fueron encontrados por Derkx y Karssen (1993, 1994), quienes encontraron que en semillas de *Sisymbrium officinale* y *Arabidopsis thaliana* enterradas en el campo, la sensibilidad a la luz se incrementaba como resultado de la salida de la dormición, y disminuía durante la inducción en dormición secundaria. El modelo desarrollado en este Capítulo junto al modelo desarrollado por Batlla y Benech-Arnold (2005) considera las variaciones en la temperatura media diaria a las que pueden estar expuestas las semillas en condiciones de campo para predecir los cambios en la respuesta de la población de semillas a la calidad y a la cantidad de luz. Estos resultados muestran que la sensibilidad que presentan las semillas de *P. aviculare* a la luz cuando el nivel de dormición es mínimo, disminuye rápidamente durante la inducción en dormición secundaria en un proceso que responde en forma positiva a la temperatura.

Los resultados obtenidos demuestran que la sensibilidad a la luz varía en relación con el nivel de dormición de las semillas, y que a su vez, estos cambios en el nivel de dormición se encuentran regulados por la temperatura. Para el caso de *P. aviculare*, una especie de emergencia primavera-verano, la adquisición de respuestas del tipo VLFR o LFR dependerá en gran medida de las temperaturas experimentadas por las semillas enterradas en el suelo durante el invierno. Sin embargo, estas respuestas se vieron afectadas cuando se incrementa la temperatura durante la primavera - verano. Predecir estos cambios en la sensibilidad a la luz permitiría determinar el momento en el cual la población de semillas enterradas en el suelo presenta una extrema sensibilidad a la luz o una mínima sensibilidad a la luz. En función de la información obtenida por el modelo, permitiría por un lado planificar la realización de labores de forma de determinar la emergencia de un alto porcentaje de la población de semillas para su posterior control, y por otro lado, realizar las labores en el momento en el cual la población de semillas posea una baja sensibilidad a la luz, de forma de disminuir la emergencia de malezas del banco de semillas previo a la siembra del cultivo.

El segundo modelo (2) permite simular los cambios en la sensibilidad de semillas de *P. aviculare* a las temperaturas fluctuantes, medida como respuesta al número de ciclos de composición definida (10/24 °C) de temperaturas alternadas (Fig. 4.11). El modelo predice los cambios en la fracción de la población de semillas que requieren temperaturas fluctuantes (cantidad de ciclos de temperatura fluctuante requeridos) para terminar la dormición, en función de la temperatura experimentada durante el tiempo que estuvieron enterradas en el suelo. Este modelo en conjunto con el modelo de luz, complementa al modelo desarrollado en el Capítulo 2, ya que permite la estimación de la fracción de la población que podría germinar por exposición de las semillas a ciclos de temperaturas fluctuantes, en adición a la fracción que no requiere de temperaturas fluctuantes y que, consecuentemente, podría germinar tan pronto como la temperatura del suelo se encuentre dentro del rango térmico permisivo para la germinación. Este modelo para predecir cambios en la sensibilidad a las temperaturas alternadas es análogo, aunque opuesto, al modelo desarrollado por Batlla et al. (2003) para la salida de la dormición primaria en semillas de *P. aviculare* (Fig. 4.6).

El modelo relaciona cambios en dos parámetros ( $C$  y  $K$ ), los cuales determinan la forma de las curvas de respuesta a un número creciente de ciclos de temperaturas

fluctuantes, en relación con la acumulación de unidades de tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ) por encima de una temperatura umbral de 7,9 °C, (Fig. 4.11). La relación obtenida entre  $C$ ,  $K$  y  $DI_{tt}$  permite estimar la fracción de la población que requiere de fluctuaciones de temperatura para terminar con la dormición durante la inducción en dormición secundaria. En condiciones de campo las semillas están expuestas a las fluctuaciones diarias de temperatura (temperatura máxima y temperatura mínima); sin embargo, no todas las fluctuaciones de temperatura tienen un efecto terminador sobre la dormición. Para el caso de *P. aviculare* está demostrado que el régimen de temperaturas alternadas óptimo al cual presentan un mayor efecto inductivo son 10 / 24 °C (12 / 12hs) (Batlla et al., 2003). Para considerarse ciclo inductivo, la temperatura mínima diaria debía ser mayor a los 10 °C y la amplitud térmica (calculada como temperatura diaria máxima – temperatura diaria mínima) debía superar los 14 °C. Predecir qué fracción de la población podría germinar cuando las fluctuaciones de temperatura son inductivas en función del número de ciclos, permitiría determinar el momento en el cual la población de semillas enterradas en el suelo presenta una alta sensibilidad a las temperaturas alternadas o una mínima sensibilidad. Esto permitiría como se dijo anteriormente, planificar medidas de control más eficaces que logren disminuir la emergencia de malezas del banco de semillas previa a la siembra del cultivo.

Los modelos, tanto el de luz como el de temperaturas alternadas fueron evaluados en condiciones de campo. Los resultados obtenidos a campo y los predichos por los modelos mostraron una adecuada descripción de los cambios en la fracción de la población de semillas que requieren de luz y de fluctuaciones de temperaturas para terminar la dormición durante la salida de la dormición primaria ( $S_{tt}$ , Batlla y Benech-Arnold, 2003) e inducción en dormición secundaria ( $DI_{tt}$ , Capítulo 2) en función de la temperatura del suelo (Fig. 4.4 y 4.12). Utilizar los dos modelos en conjunto permitió contemplar variaciones diarias en la temperatura experimentada por las semillas, los cuales lograron estimar la fracción de la población que presentan respuestas del tipo VLFR, LFR y germinación en oscuridad y también calcular los parámetros  $C$  y  $K$  adecuadamente. Los modelos lograron predecir adecuadamente los porcentajes de germinación obtenidos a campo.



# **CAPÍTULO 5**

## **DISCUSIÓN GENERAL**



## CAPÍTULO 5

### 5. DISCUSIÓN GENERAL

#### 5.1 Introducción

En este Capítulo se retomará la discusión acerca de los principales resultados de la tesis para construir un esquema general del trabajo, y se discutirá en qué medida los resultados obtenidos permiten rechazar o no las hipótesis planteadas en el Capítulo 1. También se considerará cómo los resultados de esta tesis complementan el modelo conceptual planteado por Benech-Arnold et al. (2000), y se destacará el aporte de dichos resultados al avance del conocimiento y sus posibles aplicaciones en el área en la que la investigación se llevó a cabo. Por último, se presentarán nuevas interrogantes derivadas de la tesis y se plantearán futuras líneas de investigación.

#### 5.2 Esquema general y contraste de hipótesis

El objetivo general de esta tesis fue *estudiar los procesos de salida de dormición primaria e inducción en dormición secundaria en semillas de *Polygonum aviculare* L. en función del ambiente térmico e hídrico*. Para abordar este objetivo general, se propuso *estudiar el papel de la temperatura sobre la inducción en dormición secundaria* (Objetivo específico (1)) y *estudiar el papel de la disponibilidad hídrica como modulador de la dinámica de la salida de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria en semillas de *P. aviculare** (Objetivo específico (2)). Luego se propuso *cuantificar los cambios en la sensibilidad a la luz y a las temperaturas fluctuantes durante la inducción en dormición secundaria* (Objetivo específico (3)). Finalmente, en función de la cuantificación de las relaciones encontradas, *se propuso desarrollar modelos matemáticos para simular cambios cíclicos en el nivel de dormición en poblaciones de semillas enterradas de *P. aviculare*, y poner a prueba su funcionamiento con datos de emergencia obtenidos a campo* (Objetivo específico (4)).

Los resultados obtenidos en cada uno de los Capítulos detallados anteriormente demuestran que los cambios en el nivel de dormición en semillas de *P. aviculare* se encuentran controlados por la temperatura, y que este efecto de la temperatura es modulado por la disponibilidad hídrica a la que están sometidas las semillas durante el tiempo que permanecen enterradas en el suelo (Capítulo 2 y Capítulo 3). A su vez, los cambios en la sensibilidad a la luz y a las temperaturas fluctuantes durante la inducción en dormición secundaria dependen de la temperatura que modifica el nivel de dormición de la población de semillas (Capítulo 4).

Sobre la base de los resultados encontrados en cada Capítulo se discutirá en qué medida los resultados obtenidos permiten rechazar o no las hipótesis planteadas en el Capítulo 1. Los resultados del Capítulo 2 muestran que la tasa con la cual el nivel de dormición se incrementa, depende de la temperatura a la cual las semillas se expusieron durante la inducción en dormición secundaria; cuanto mayor es la temperatura, más alta es la tasa de inducción en dormición. Este incremento se evidenció a partir de una temperatura umbral de 7,9 °C, temperatura a la cual, o por encima de la cual, la inducción en dormición secundaria tiene lugar. Por lo tanto, la hipótesis 2, que propone que: *“la entrada en dormición secundaria ocurre a partir de una temperatura umbral, por encima de la cual la inducción tiene lugar a mayor o menor velocidad dependiendo de los días de exposición y la temperatura predominante”* es aceptada.

En el Capítulo 3 se muestra que la disponibilidad hídrica juega un papel

importante como modulador del efecto de la temperatura sobre los cambios en el nivel de dormición en semillas de *P. aviculare* enterradas en el suelo. Los estudios realizados durante la salida de la dormición primaria permitieron identificar un valor mínimo umbral de 15% de contenido hídrico en la semilla (*CHS*), por encima del cual, el proceso de estratificación tiene lugar (por debajo de este valor no hay modificaciones en el nivel de dormición) (Fig. 3.5). A partir de este umbral (>15%), la tasa con la cual las semillas salen de la dormición primaria es dependiente del *CHS*: cuanto mayor es el *CHS*, mayor es la tasa de salida de la dormición hasta alcanzar un valor máximo de salida (31%), por encima del cual la tasa de salida de la dormición ya no se modifica. Sobre la base de estas evidencias se acepta la hipótesis (1a) que propone que: *“durante el proceso de salida de la dormición primaria el contenido hídrico del suelo afecta la tasa con la cual las semillas de P. aviculare salen de la dormición”*.

La hipótesis (1b) plantea que: *“durante el proceso de inducción en dormición secundaria el contenido hídrico afecta la tasa con la cual las semillas de P. aviculare son inducidas en dormición secundaria”*. Esta hipótesis se acepta parcialmente ya que, durante la entrada en dormición secundaria, el *CHS* reguló los cambios en el nivel de dormición de dos formas: 1) el *CHS* indujo por sí solo (independientemente de la temperatura) la entrada en dormición secundaria cuando el *CHS* fue llevado por debajo de 15%. 2) La inducción en dormición secundaria ocurrió a una tasa diferente a partir de *CHS* >15%: cuanto mayor fue el *CHS* mayor fue la tasa con la cual las semillas fueron inducidas en dormición hasta un valor de 32% de *CHS*, por encima del cual, la tasa de entrada en dormición secundaria ya no se modificó (Capítulo 3; Fig. 3.8). La idea de abordar los efectos de la disponibilidad hídrica en esta tesis surgió porque este factor ha sido muy poco estudiado y mucho menos considerado en los modelos predictivos de dormición.

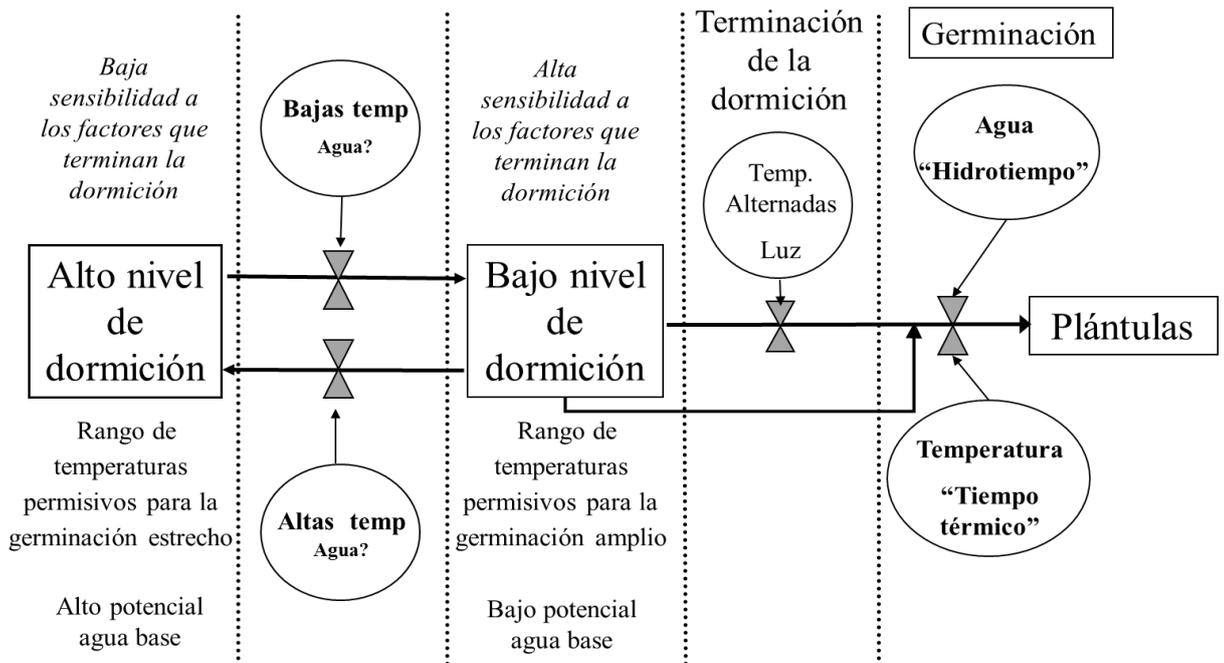
En el Capítulo 4, se observó que la alta sensibilidad que presentan las semillas a los factores terminadores de la dormición (i.e. luz y temperaturas alternadas) cuando el nivel de dormición es mínimo (Fig. 4.1 y 4.6), disminuye rápidamente durante la inducción en dormición secundaria como consecuencia del aumento en el nivel de dormición (Fig. 4.2 y 4.7 - 4.10). Estos cambios en la sensibilidad estuvieron asociados directamente a la temperatura predominante, el nivel de dormición de la población de semillas y el tiempo de exposición a temperaturas inductivas durante la inducción en dormición secundaria. Sobre la base de estos resultados, la hipótesis 3 que propone que: *“durante la inducción en dormición secundaria disminuye gradualmente la sensibilidad a la luz y a las temperaturas alternadas”* esta hipótesis se acepta parcialmente.

La determinación de los cambios en el nivel de dormición de la población de semillas a través de la respuesta a los distintos factores ambientales estudiados en la presente tesis (temperatura, disponibilidad hídrica, luz y temperaturas fluctuantes), permite visualizar en su conjunto la dinámica de los cambios en el rango de condiciones ambientales que permiten la germinación a medida que la población de semillas sale de la dormición y/o son inducidas en dormición secundaria.

### **5.3 Avances en el Modelo conceptual**

El modelo conceptual sobre el cual se basó esta tesis se presenta en la figura (5.1). Este modelo conceptual fue planteado por Benech-Arnold et al. (2000). El mismo se basa en la clasificación que divide a los factores ambientales en dos categorías según su efecto sobre la dormición: (i) aquellos que modulan los cambios en el nivel de dormición de las poblaciones de semillas, como ha sido explicado anteriormente, la temperatura y sus interacciones con el contenido hídrico del suelo, y (ii) aquellos que remueven los últimos

impedimentos para la germinación: luz y fluctuaciones de temperatura. No obstante, es importante señalar que el pasaje por todo el diagrama de flujo no es en absoluto la única posibilidad para una población de semillas. Por el contrario, el diagrama pretende ilustrar los diferentes “caminos” que una población de semillas puede seguir. Por ejemplo, una población puede ser dispersada con un bajo nivel de dormición, y puede o no, requerir estímulos para terminar la dormición, o en todo caso, puede ser inducida en dormición secundaria.



**Figura 5.1** Diagrama de flujo representando los cambios en el nivel de dormición, la terminación de la dormición y la germinación en las poblaciones de semillas y los factores ambientales más relevantes en la regulación de cada proceso (Adaptado de Benech-Arnold et al., 2000).

Este modelo conceptual fue utilizado por Batlla y Benech-Arnold (2003, 2005, 2006) y Batlla et al. (2003), y permitió profundizar aspectos de la regulación ambiental de la salida de la dormición primaria en semillas de *Polygonum aviculare*. Los estudios llevados a cabo en esta tesis, no sólo permitieron consolidar el marco teórico presentado en la figura (5.1), sino que además permitieron avanzar en el conocimiento del estudio de la regulación ambiental de la inducción en dormición secundaria. A su vez, la aproximación llevada a cabo en esta tesis permitió cuantificar el efecto de estos factores (factores que regulan cambios en el nivel de dormición y factores que remueven las últimas impedancias para que ocurra la germinación) y desarrollar modelos que hacen posible predecir los patrones temporales de cambio en el nivel de dormición de los bancos de semillas de *P. aviculare* en condiciones de campo. A pesar de que en los Capítulos anteriores se presentaron los modelos desarrollados en forma separada, el haber utilizado un índice común de tiempo térmico de Inducción en Dormición ( $DI_{tt}$ , el inglés, *Dormancy Induction thermal time*) para cuantificar el efecto de la temperatura sobre la respuesta de la población de semillas a los diferentes factores estudiados, hace posible el enlace de todas las relaciones encontradas en un modelo único.

#### 5.4 Contribución al avance del conocimiento: Desarrollo de modelos predictivos

El control de malezas es una de las prácticas de manejo más intensivas en los sistemas de producción agrícola, y tiene impacto tanto en la productividad como en el

ambiente (Radosevich et al., 1997; Van Acker, 2009). Es por ello que surgen los modelos como herramientas para representar, predecir y ayudar a comprender mejor los fenómenos específicos relacionados con las malezas y su comportamiento, derivando a partir de los mismos, prácticas de manejo y control más eficientes.

Los modelos ayudan a proporcionar una descripción detallada de los procesos ecofisiológicos básicos que subyacen a la emergencia de las malezas en condiciones de campo (es decir, la dormición, la germinación y el crecimiento previo a la emergencia) (Finch-Savage, 2004; Chantre et al., 2009). Sin embargo, una de las limitaciones principales para la elaboración de estos modelos es la frecuente presencia de dormición en las poblaciones de semillas de muchas especies maleza de importancia agronómica (Grundy, 2003; Batlla y Benech-Arnold, 2010).

**Cuadro 5.1** Valores estimados de tiempo térmico de estratificación ( $S_{tt}$ ) y tiempo térmico de inducción en dormición ( $DI_{tt}$ ), temperatura del límite inferior del rango térmico permisivo para la germinación ( $T_{l(50)}$ ), contenido hídrico en las semillas ( $CHS\%$ ), desviación standard de la temperatura del límite inferior del rango térmico permisivo para la germinación ( $\sigma_{Tl(50)}$ ), parámetros que determinan la respuesta de la población de semillas a los ciclos de fluctuaciones térmicas ( $C$  y  $K$ ), porcentajes de la población de semillas que presentan respuesta de tipo LFR, VLFR y que son capaces de germinar en ausencia de luz (OSC), para diferentes fechas de siembra durante el año y diferentes condiciones de temperatura y contenido hídrico en las semillas. Las líneas (-) significa que no se obtuvieron valores de  $T_{l(50)}$  para esas fecha de siembra.

Fecha de siembra	$S_{tt}$ (°Cd)	$DI_{tt}$ (°Cd)	$CHS$ (%)	$T_{l(50)}$ * (°C)	$T_{l(50)}$ ** (°C)	$\sigma_{Tl(50)}$	$C$	$K$	VLFR (%)	LFR (%)	OSC (%)
Escenario 1 (Año cálido + seco)											
15 junio (a)	138	0	33,1	17,4	-	0,7	44,9	0,186	0	0	0
15 septiembre (b)	388	71	21,5	16,5	17	1,7	37,1	0,309	5	35,5	0,5
Escenario 2 (Año frío + húmedo)											
15 junio (a)	148	0	26,5	17,6	-	2	41,1	0,248	0	0	0
15 septiembre (b)	799	23	15,5	15,5	14,8	2,8	21,2	0,576	51	67,5	9

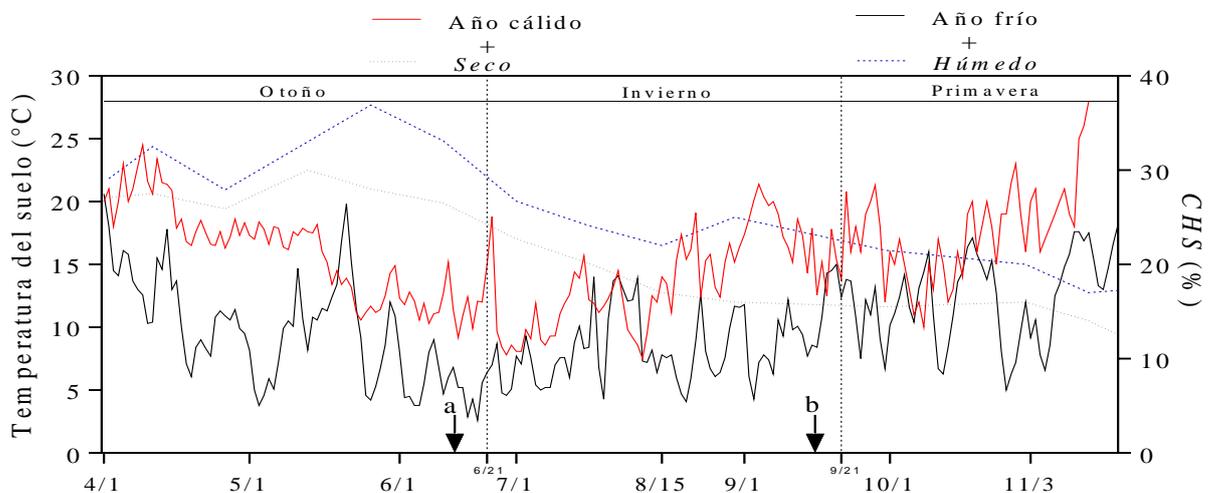
\*  $T_{l(50)}$  durante la salida de la dormición primaria

\*\*  $T_{l(50)}$  durante la inducción en dormición secundaria

Para comprender cómo podrían ser utilizados los modelos desarrollados en los Capítulos 2, 3 y 4 para la planificación de estrategias de control de malezas, se realizó una simulación con datos de temperatura y disponibilidad hídrica en el suelo para dos años con diferentes condiciones ambientales (Fig. 5.2) con el objetivo, además, de visualizar cómo funcionan los cambios en el nivel de dormición en el banco de semillas de *P. aviculare* dentro del modelo teórico planteado en esta sección (Fig. 5.1). La predicción de los valores consistió en evaluar dos escenarios climáticos: (1) un año frío - húmedo y (2) un año cálido - seco (Fig. 5.2). Las situaciones propuestas son: (a) siembra temprana de un cultivo de trigo (mediados de junio) y (b) siembra temprana de un cultivo de maíz (mediados de septiembre). Para realizar las simulaciones se calcularon los valores de  $S_{tt}$  (del inglés, *Stratification thermal time*) y  $DI_{tt}$  que acumularían las semillas enterradas en el suelo para cada fecha de siembra en función de la temperatura media diaria del suelo y la disponibilidad hídrica en el suelo a través del nivel de hidratación de las semillas (medida como el contenido hídrico en las semillas  $CHS\%$ ) registrada a una profundidad de 5 cm (Cuadro 5.1). Sobre la base de los valores de  $S_{tt}$  y  $DI_{tt}$  calculados, y

considerando dos escenarios con diferentes *CHS*, se estimaron los parámetros que definen el rango térmico permisivo para la germinación ( $T_{l(50)}$ ), y los parámetros que definen la respuesta a los ciclos de temperaturas fluctuantes y los diferentes tipos de respuesta a la luz en función de los  $^{\circ}\text{Cd}$  acumulados tanto para la salida de la dormición primaria como para la inducción en dormición secundaria.

Para estimar el porcentaje de la población que emergería en cada fecha de siembra en función de las condiciones de temperatura y contenido hídrico en las semillas, se utilizó la temperatura media diaria del suelo a 5 cm de profundidad tomando un período de 15 días luego de la realización de la labor, y fueron utilizados los mismo valores de  $T_{h(50)} = 18.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\sigma_{Th} = 0.1$ ,  $T_b = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_o = 16\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $T_m = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , previamente utilizados en el Capítulo 2. A su vez, se determinó la cantidad de ciclos de temperaturas alternadas inductivos al que se encontraron expuestas las semillas durante ese periodo de tiempo. Para considerarse ciclo inductivo, la temperatura mínima diaria debía ser mayor a los  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la amplitud térmica (calculada como temperatura diaria máxima - temperatura diaria mínima) debía superar los  $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los cambios en la sensibilidad a la luz fueron estimados de acuerdo a los  $^{\circ}\text{Cd}$  acumulados en función de la temperatura media diaria del suelo, dependiendo de cuál modelo acumula más  $^{\circ}\text{Cd}$  ( $S_{tt}$  o  $DI_{tt}$ ). Por ejemplo, durante la salida de la dormición primaria, los cambios en la sensibilidad a la luz estuvieron asociados con la acumulación de  $S_{tt}$ , cada vez que la temperatura media diaria registrada a 5 cm de profundidad se encontró por debajo de  $17\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Batlla y Benech-Arnold, 2003). En cambio, durante la inducción en dormición secundaria estuvieron asociados con la acumulación de  $DI_{tt}$  cada vez que la temperatura media diaria registrada a 5 cm de profundidad se encontró por encima de  $7,9\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Capítulo 2).



**Figura 5.2** Temperatura y contenido hídrico en las semillas (*CHS%*) registrados a 5 cm de profundidad en el campo durante un año cálido - seco y un año frío - húmedo. Las letras y las flechas indican el momento en el que se realizará la labor de labranza en el campo. La línea roja continua representa la temperatura para un año cálido y la línea roja discontinua representa un año frío. La línea azul discontinua representa un año húmedo (altos niveles de hidratación en las semillas) y la línea negra punteada representa un año seco (bajos niveles de hidratación en las semillas). Las líneas verticales discontinuas representan el cambio de una estación a otra.

En el caso del escenario 1 (año cálido y seco; Fig. 5.2) y para una siembra temprana (a) de trigo (mediados de junio), los valores de temperatura del suelo registrados durante este período ( $< 14\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) no ingresarían dentro del rango térmico permisivo para la germinación, ya que los valores de  $T_l$  de la población de semillas (determinados por  $T_{l(50)}$ )

= 17,4 °C y  $\sigma_{T1} = 0.7$ ; Cuadro 5.1) serían superiores a los 14 °C. Debido a ello, y al hecho de que tampoco se registraron ciclos de temperaturas fluctuantes con características inductivas durante dicho período, no se produciría emergencia de plántulas como consecuencia de las labores que preceden la siembra del cultivo. Utilizando el modelo de cambios en la sensibilidad a la luz desarrollado en el Capítulo 4 se llega a la misma conclusión, ya que la población de semillas no germinaría ante la realización de una labranza (Cuadro 5.1). Cabe aclarar que el valor de *CHS* (%) considerado para la simulación (33,1%), como el momento de realizar la labranza, no fue limitante; sin embargo, la germinación no ocurriría debido a las condiciones anteriormente mencionadas (la población de semillas presentaba un nivel de dormición alto). Resultados similares fueron encontrados para el escenario 2 en fecha de siembra temprana, donde los parámetros calculados no fueron diferentes de los parámetros calculados para el escenario 1 (Cuadro 5.1).

En el caso de la siembra a mediados de septiembre (b) y para el escenario 1 (año cálido y seco), debido a que en los meses de julio y agosto las temperaturas no fueron muy bajas, se acumularon pocas unidades de  $S_{tt}$  (388 °Cd) y por lo tanto, la disminución de la  $T_{l(50)}$  ( $T_{l(50)} = 16,5$  °C y  $\sigma_{T1} = 1,7$ ; Cuadro 5.1) fue mínima. Debido al incremento de las temperaturas, el modelo de  $DI_{tt}$  empezó a acumular más °Cd diarios, y los cálculos para estimar la fracción a germinar se realizó en base a  $T_{l(50)} = 17$  °C ( $\sigma_{T1} = 1,7$ ) en función de un *CHS* de 21,5% (Cuadro 5.1; \*\* $T_{l(50)}$  calculada para la inducción en dormición). En este caso (fecha de siembra, b), la temperatura del suelo ingresó al rango térmico permisivo para la germinación y la fracción de la población de semillas calculada que podría germinar fue de 18%. En cuanto a las temperaturas fluctuantes, se registraron 3 ciclos de fluctuación térmica con características inductivas durante los 15 días posteriores a la siembra, lo que permitió calcular un 36% de la población en condiciones de germinar. No obstante, se registraron 4 ciclos térmicos con amplitudes entre 10 °C y 12 °C. Debido a que probablemente ciclos con esta amplitud podrían haber tenido algún efecto terminador de la dormición en semillas de *P. aviculare*, en condiciones de campo se podría esperar un porcentaje de emergencia algo superior al calculado. Para tener en cuenta el efecto de ciclos de menor amplitud sería necesario realizar estudios con el objetivo de determinar cuál es el efecto de ciclos de diferente amplitud térmica sobre la germinación de *P. aviculare*, y cómo cambia la sensibilidad a la amplitud térmica de los ciclos con los cambios en el nivel de dormición de la población de semillas. Finalmente, utilizando el modelo desarrollado en el capítulo 4 (modelo de luz), fue posible predecir que el 40% de la población presentaría respuestas de tipo LFR, 5% respuestas del tipo VLFR y 0,5% germinaría en oscuridad.

En el caso del escenario 2 (año frío y húmedo y para la fecha de siembra en septiembre; b), las condiciones fueron distintas al escenario 1. Las bajas temperaturas experimentadas durante los meses de julio y agosto permitieron la acumulación de un número importante de unidades de  $S_{tt}$  (799 °Cd), la  $T_{l(50)}$  disminuiría considerablemente presentando un valor de 14,8 °C y un desvío de 2,8 (Cuadro 5.1), aún en condiciones de *CHS* de 15,5% (muy cerca del valor umbral de *CHS* 15%, valor por encima del cual el proceso de  $S_{tt}$  tiene lugar). Esta ampliación del rango térmico permisivo para la germinación por efecto de las bajas temperaturas del invierno, determinaría porcentajes de germinación del 51%. Por otro lado, debido a las bajas temperaturas imperantes durante el mes de septiembre, no se registraron cambios en la  $T_{l(50)}$  en función de  $DI_{tt}$ , la diferencia en °Cd acumulados entre un modelo y otro fue mayor para  $S_{tt}$ . El criterio para usar un  $S_{tt}$  o  $DI_{tt}$  tiene que ver con cuánto cambia la  $T_{l(50)}$  en función de los °Cd acumulados por las semillas en el banco de semillas. En el caso de las fluctuaciones de

temperatura, fueron mayores que en el escenario 1, ya que se registraron 7 ciclos de fluctuación térmica con características inductivas durante los 15 días posteriores a la siembra, lo que permitió predecir un 72% de la población en condiciones de germinar. Por otro lado, utilizando el modelo desarrollado en el capítulo 4 (modelo de luz), se predijo que el 67,5% de la población presentaría respuestas de tipo LFR, 51% respuestas del tipo VLFR y 9% germinaría en oscuridad.

La realización de labores asociadas a las diferentes fechas de siembra determinaría la emergencia de distintos porcentajes del banco de semillas en relación con el nivel de dormición que presente la población al momento de la realización de la labor. Así, semillas que hayan acumulado más unidades de  $S_{tt}$  o  $DI_{tt}$  al momento de la realización de la labranza determinarán cuál es el proceso predominante, y el porcentaje de emergencia estará determinado por los cambios que puedan ocurrir en el nivel de dormición. Los resultados obtenidos para los dos escenarios y las dos fechas de siembra permitirían planificar diferentes estrategias de control de esta maleza, tanto en el corto como en el largo plazo. Por ejemplo, en el caso de sembrar un maíz en septiembre, las labranzas asociadas a la preparación de la cama de siembra determinarían la emergencia de un alto porcentaje del banco de semillas si el año es frío y el *CHS* se encuentra por encima de 15%. Esto, permitiría el control tanto por métodos mecánicos como químicos de una alta proporción de individuos de la población, lo cual tendría un gran impacto en la dinámica poblacional de la especie.

La aproximación poblacional utilizada para desarrollar los modelos predictivos presentados en esta tesis, pone en evidencia la importancia de cuantificar la variabilidad de respuesta que existe dentro de las poblaciones de semillas si se quiere predecir qué fracción de la población responderá ante un estímulo determinado.

### **5.5 Nuevas interrogantes y futuras líneas de investigación**

Esta tesis permitió avanzar en el estudio de los cambios cíclicos en el nivel de dormición desde un punto de vista integral, abordando aspectos que tienen que ver con la generación de herramientas predictivas (modelos), y la dilucidación de mecanismos comunes implicados en la regulación de la dormición primaria e inducción en dormición secundaria. Los modelos predictivos desarrollados en esta tesis permitieron predecir adecuadamente los cambios cíclicos en el nivel de dormición (salida de dormición primaria e inducción en dormición secundaria) en semillas de *P. aviculare*, en función de la temperatura (Capítulo 2) y la disponibilidad hídrica (Capítulo 3); también permitieron predecir los cambios en la sensibilidad a los factores terminadores de la dormición (i.e. luz y temperaturas alternadas) (Capítulo 4).

Este trabajo de tesis permitió identificar un rango de temperaturas entre 7,9 y 17 °C en que las mismas pueden o promover la salida de la dormición primaria, o inducir la dormición secundaria. La tasa de cambio con la que ocurre cada proceso se encuentra estrechamente relacionada con el nivel de dormición que presente la población y la temperatura predominante. Estos hallazgos permiten entender que la dormición es un proceso complejo, dinámico y que se está modificando constantemente en función de las condiciones ambientales.

Como es de esperarse, los umbrales varían entre las especies anuales de verano e incluso entre las poblaciones de la misma especie que crecen en diferentes ambientes. Por lo tanto, para poder evaluar la robustez del modelo es necesario correr los modelos generados en diferentes ambientes, y a su vez, extrapolarlo a otras especies de comportamiento primavero-estival.

## 5.6 Conclusiones

En la presente tesis se llevaron a cabo estudios que permitieron:

- Caracterizar el papel de la temperatura y su interacción con la disponibilidad hídrica en la regulación de los cambios en el nivel de dormición que experimentan las poblaciones que forman los bancos de semillas de *P. aviculare*.
- Entender cómo cambia la sensibilidad a la luz y a las temperaturas alternadas durante la entrada en dormición secundaria dependiendo de la temperatura y del nivel de dormición de la población de semillas.
- La cuantificación de las relaciones encontradas y la inclusión de las mismas en un modelo matemático que sirve de base para la predicción confiable de la dinámica de la emergencia.

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan un importante avance al conocimiento del fenómeno de la dormición, a la construcción de futuros modelos predictivos de emergencia con el fin de generar estrategias de control más eficaces y racionales de malezas.



## BIBLIOGRAFÍA

- Allen PA. (2003). When and how many? Hydrothermal models and the prediction of seed germination. *New Phytologist*, 158: 1-3.
- Allen PS y Meyer SE (1998). Ecological aspects of seed dormancy loss. *Seed Science Research*, 8: 1983-191.
- Allen PS, Benech-Arnold RL, Batlla D y Bradford KJ (2007). Modeling of seed dormancy. Pp 72-112. In: Bradford KJ, Nonogaki H (eds.) *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing, UK.
- Allen PS, Meyer SE y Khan MA (2000). Hydrothermal time as a tool in comparative germination studies. En: *Seed biology, advances and applications*. (Eds M Black, KJ Bradford, J Vázquez-Ramos) pp. 401-410. (University Press: Cambridge).
- Allen PS, White DB y Markhart III AH (1993). Germination of perennial ryegrass and annual bluegrass seeds subjected to hydration-dehydration cycles. *Crop Science*, 33: 1020-1025.
- Alonso SI (1984). Período de emergencia de las principales malezas del sudoeste bonaerense. *Información para Extensión, Serie Producción Vegetal, Vol. II N° 14*, EERA Balcarce.
- Alvarado V y Bradford KJ (2005). Hydrothermal time analysis of seed dormancy in true (botanical) potato seeds. *Seed Science Research*, 15: 77-88.
- Amen RD (1968). A model of seed dormancy. *Botanical Review* 34: 1-31.
- Arana MV, González-Polo M, Martínez-Meier A, Gallo LA, Benech-Arnold RL, Sánchez RA y Batlla D (2015). Seed dormancy responses to temperature relate to *Nothofagus* species distribution and determine temporal patterns of germination across altitudes in Patagonia. *New Phytologist*, 209: 1-14.
- Bae G y Choi G (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual Review of Plant Biology* 59:281-311. Doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092859
- Bair NB, Meyer SE y Allen PS (2006). A hydrothermal after-ripening time model for seed dormancy loss in *Bromus tectorum* L. *Seed Science Research*, 16: 17-28.
- Baskin CC y Baskin JM (1981). Seasonal changes in germination responses of buried seeds of *Verbascum thapsus* and *Verbascum blattaria* and ecological implications. *Canadian Journal of Botany*, 75 (2): 286-305.
- Baskin CC y Baskin JM (1988). Germination ecophysiology of herbaceous plant species in temperate region. *American Journal of Botany* 75 (2): 286-305.
- Baskin CC y Baskin JM (1998). *Seed Dormancy and Germination: Ecology,*

Biogeography and Evolution. (Academic Press: San Diego).

Baskin CC y Baskin JM (2006). The natural history of soil seed banks of arable land. *Weed Science*, 54, 549–557.

Baskin JM y Baskin CC (1977). Role of temperature in the germination ecology of three summer annual weeds. *Oecologia*, 30: 377-382.

Baskin JM y Baskin CC (1978). Seasonal changes in the germination response of *Cyperus inflexus* seed to temperature and their ecological significance. *Botanical Gazette*, 139: 231-235.

Baskin JM y Baskin CC (1980). Ecophysiology of secondary dormancy in seeds of *Ambrosia artemisiifolia*. *Ecology*, 61: 475-480.

Baskin JM y Baskin CC (1982). Effects of wetting and drying cycles on the germination of seeds of *Cyperus inflexus*. *Ecology*, 63: 248-252.

Baskin JM y Baskin CC (1983). Germination and ecology of *Veronica arvensis*. *Journal of Ecology*, 71, 57-68.

Baskin JM y Baskin CC (1985). The annual dormancy cycle in buried weed seeds: A continuum. *BioScience*, 35: 492-498.

Baskin JM y Baskin CC (1989). Cedar glade endemics in Tennessee, and a review of their autecology. *Journal of the Tennessee Academy of Science*, 64: 63-74.

Baskin JM y Baskin CC (1990). The role of light and alternating temperatures on germination of *Polygonum aviculare* seeds exhumed on various dates. *Weed research*, 30 (6): 397-402.

Batlla D y Benech-Arnold RL (2003). A quantitative analysis of dormancy loss dynamics in *Polygonum aviculare* L. seeds: development of a thermal time model based on changed in seed population thermal parameters. *Seed Science Research*, 13: 55-68.

Batlla D y Benech-Arnold RL (2004). A predictive model for dormancy loss in *Polygonum aviculare* L. seeds based on changes in population hydrotime parameters. *Seed Science Research*, 14: 277-286.

Batlla D y Benech-Arnold RL (2005). Changes in light sensitivity of *Polygonum aviculare* L. buried seeds in relation to cold-induced dormancy loss. Development of a predictive model. *New Phytologist*, 165: 445-452.

Batlla D y Benech-Arnold RL (2006). The role of fluctuations in soil water content on the regulation of dormancy changes in buried seeds of *Polygonum aviculare* L. *Seed Science Research*, 16:47–59.

Batlla D y Benech-Arnold RL (2007). Predicting changes in dormancy level in weed seed soil banks. Implications for weed management. *Crop Protection* 26 (3), pág. 189–197. DOI: 10.1016/j.cropro.2005.07.014.

Batlla D y Benech-Arnold RL (2010). Predicting changes in dormancy level in natural

seed soil banks. *Plant Molecular Biology*, 73: 3-13.

Batlla D y Benech-Arnold RL (2015). A framework for the interpretation of temperature effects on dormancy and germination in seed populations showing dormancy. *Seed Science Research*, pp 1-12.

Batlla D, Grundy A, Dent KC, Clay HA y Finch-Savage WE (2009). A quantitative analysis of temperature-dependent dormancy changes in *Polygonum aviculare* seeds. *Weed Research*, 49: 428-438.

Batlla D, Kruk B y Benech-Arnold R (2000). Very early detection of canopy presence by seeds through perception of subtle modifications in R:FR signals. *Functional Ecology*, 14 (2): 195-202.

Batlla D, Kruk BC y Benech-Arnold RL (2004). Modelling changes in dormancy in weed soil seed banks: implications for the prediction of weed emergence. In: Benech-Arnold R, Sanchez R, (Eds). *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*. Oxford, UK: THRP, 245-264.

Batlla D, Nicoletta M y Benech-Arnold RL (2007). Sensitivity of *Polygonum aviculare* seeds to light as affected by soil moisture conditions. *Annals of Botany* 99 (5), pág. 915–924. DOI: 10.1093/aob/mcm029.

Batlla D, Verges V y Benech-Arnold RL (2003). A quantitative analysis of seed responses to cycle-doses of fluctuating temperatures in relation to dormancy level. Development of a thermal-time model for *Polygonum aviculare* L. seeds. *Seed Science Research*, 13:197-207.

Bauer MC, Meyer S y Allen P (1998). A simulation model to predict seed dormancy loss in the field for *Bromus tectorum* L. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1235-1244.

Benech-Arnold RL y Sanchez RA (1995). Modeling weed seed germination. In: Kigel J, Galili G, eds. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 545-66.

Benech-Arnold RL, Batlla D, Guglielmini AC y Kruk BC (2014). Ecología de Malezas II: La reanudación del crecimiento y el aumento del área. En: Fernández OA, Leguizamón ES, Acciaresi HA, (Eds). *Malezas e invasoras de la Argentina*. Editorial de la Universidad del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Pp:139-169.

Benech-Arnold RL, Ghera CM y Sanchez RA (1988). The role of fluctuating temperatures in the germination and establishment of *Sorghum halepense* (L.) Pers.-regulation of germination under leaf canopies. *Functional Ecology*, 2: 311-318.

Benech-Arnold RL, Ghera CM, Sánchez RA y Insausti P (1990a). Temperature effects on dormancy release and germination rate in *Sorghum halepense* (L.) Pers seeds: a quantitative analysis. *Weed Research*, 30: 81-89.

Benech-Arnold RL, Ghera CM, Sánchez RA y Insausti P (1990b). A mathematical model to predict *Sorghum halepense* seed germination in relation to soil temperature. *Weed Research*, 30: 91-99.

Benech-Arnold RL, Sánchez RA, Forcella F, Kruk BC y Ghersa CM (2000). Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research*, 67: 105-122.

Benvenuti S, Macchia M y Miele S (2001). Light, temperature and burial depth effects on *Rumex obtusifolius* seed germination and emergence. *Weed Research*, 41: 177-186

Bewley J (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9:1055-1066.

Bewley J.D. y Black M. (1982). *Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination*. Vol 2, Springer Verlag, Berlin.

Bewley JD y Black M (1994). *Seed: Physiology of Development and Germination*. New York, Plenum Press.

Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H y Nonogaki H (2013). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd Edition, Springer, Nueva York.

Bliss D y Smith H (1985). Penetration of light into soil and its role in the control of seed germination. *Plant, Cell & Environment*, 8 (7): 475-483.

Borthwick HA, Hendricks SB, Toole EH y Toole VK (1954). Action of light on lettuce seed germination. *Botanical Gazette*, 115: 205-225.

Botto JF, Sánchez RA y Casal JJ (1995). Role of phytochrome B in the induction of seed germination by light in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 146, 307–312.

Botto JF, Sánchez RA y Casal JJ (1998). Burial conditions affect light responses of *Datura ferox* seeds. *Seed Science Research* 8, 423–429.

Botto JF, Sánchez RA, Whitelam GC y Casal JJ (1996). Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 110: 439-444.

Botto JF, Scopel AL y Sánchez RA (2000). Water constraints on the photoinduction of weed seed germination during tillage. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 463–471.

Bouwmeester HJ (1990). The effect of environmental conditions on the seasonal dormancy pattern and germination of weed seeds. PhD thesis. Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

Bouwmeester HJ y Karssen CM (1992). The dual role of temperature in the regulation of the seasonal changes in dormancy and germination of seeds of *Polygonum persicaria* L. *Oecologia*, 90: 88-94.

Bouwmeester HJ y Karssen CM (1993a). Seasonal periodicity in germination of seeds of *Chenopodium album* L. *Annals of Botany*, 72: 463-473.

Bradford KJ (1995). Water relations in seed germination. In: *Seed Development and Germination*. (Eds, J Kigel, A Galili) pp. 351-396. (Marcel Dekker Inc: New York)

Bradford KJ (1996). Population-Based models describing seed dormancy behaviour: Implications for experimental design and interpretation. In: Plant dormancy. (Ed GA Lang) pp. 313-339. (CAB international: Wallingford).

Bradford KJ (2002). Applications of hydrothermal time to quantifying and modeling seed germination and dormancy. *Weed science*, 50: 248-260.

Brändel M y Jensen K (2005). Effect of temperature on dormancy and germination of *Eupatorium cannabinum* L. achenes. *Seed Science Research*, 15: 143-151.

Bulcke R, Van Himme M y Stryckers J (1988). Tolerance to amitrole in weeds in long-term experiments in fruit plantations. Proceedings of the VIII international symposium of weed ecology, biology and systematics, 8 (1): 287-295.

Casal JJ (2013). Canopy light signals and crop yield in sickness and in health. ISRN Agronomy. Volume 2013, Article ID 650439. Pp 1-16.

Casal JJ y Sánchez RA (1998). Phytochromes and seed germination. *Seed Science Research*, 8: 317-329.

Casal JJ, Candia AN y Sellaro R (2014). Light perception and signalling by phytochrome A. *Journal of experimental botany* 65 (11), pág. 2835–2845. DOI: 10.1093/jxb/ert379.

Chantre G, Batlla D, Sabbatini M y Orioli G (2009). Germination parameterization and development of an after-ripening thermal-time model for primary dormancy release of *Lithospermum arvense* seeds. *Annals of Botany*, 103: 1291-1301.

Chauhan BS y Johnson DE (2009) Germination Ecology of Spiny (*Amaranthus spinosus*) and Slender Amaranth (*A. viridis*). *Troublesome Weeds of Direct-Seeded Rice*. *Weed science*. 57 (04), pág. 379–385. DOI: 10.1614/WS-08-179.1.

Christensen M, Meyer SE y Allen PS (1996). A hydrothermal time model of seed after-ripening in *Bromus tectorum* L. *Seed Science Research*, 6: 1-9.

Clack T, Mathews S y Sharrock RA (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes. The sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant molecular biology* 25 (3), pág. 413–427.

Cone JW, Jaspers PPM y Kendrick RE (1985). Biphasic fluence-response curves for light induced germination of *Arabidopsis thaliana* L. *Planta*, 163: 43-54.

Contreras S, Bennett MA, Metzger JD, Tay D y Nerson H (2009). Red to Far-red Ratio During Seed Development Affects Lettuce Seed Germinability and Longevity. *HortScience* 44(1):130–134.

Courtney AD (1968). Seed dormancy and field emergence in *Polygonum aviculare*. *Journal of Applied Ecology*, 5: 675-684.

Derkx MPM y Karssen CM (1993). Changing sensitivity to light and nitrate but not to gibberellins regulates seasonal dormancy patterns in *Sisymbrium officinale* seeds. *Plant, Cell & Environment*, 16: 469-479.

Dyer WE (1995). Exploiting Weed Seed Dormancy and Germination requirements through Agronomic Practices. *Weed Science*, 43: 498-503.

Fenner M (1980). The induction of a light-requirement in *Bidens pilosa* seeds by leaf canopy shade. *New Phytologist*, 84, 103–106.

Finch-Savage WE (2004). The use of population-based threshold models to describe and predict the effects of seedbed environment on germination and seedling emergence of crops. In: Benech- Arnold RL, Sánchez RA (Eds). *Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture*. New York, USA: Haworth Press, 51-96.

Finch-Savage WE y Footitt S (2015). Regulation of Seed Dormancy Cycling in Seasonal Field Environments. En: James V. Anderson (ed.): *Advances in Plant Dormancy*. Cham: Springer International Publishing, pág. 35–47.

Finch-Savage WE y Leubner-Metzger G (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 505-523.

Fletcher WW (1983). Introduction. In: *Recent Advances in Weed Research*. (Fletcher WW ed.). pp 1-2. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough. R.U.

Foley ME (1994). Temperature and water status of seed affect afterripening in wild oat (*Avena fatua*). *Weed Science*, 42:200–204.

Footitt S, Clay HA, Dent K y Finch-Savage WE (2014) Environment sensing in spring-dispersed seeds of a winter annual *Arabidopsis* influences the regulation of dormancy to align germination potential with seasonal changes. *The New phytologist* 202 (3), pág. 929–939. DOI: 10.1111/nph.12694.

Footitt S, Huang Z, Clay HA, Mead A y Finch-Savage WE (2013). Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. En: *The Plant journal: for cell and molecular biology* 74 (6), pág. 1003–1015. DOI: 10.1111/tpj.12186.

Footitt S, Douterelo-Soler I, Clay H y Finch-Savage WE (2011). Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:20236–20241.

Forcella F, Benech-Arnold RL, Sánchez RA y Ghera CM (2000). Modelling seedling emergence. *Field Crops Research*, 67: 123-139.

Frankland B y Taylorson RB (1983) Light Control of Seed Germination *Encyclopedia of Plant Physiology* (eds W. Shropshire & H. Mohr), pp. 428–456. Springer Verlag, New York, NY.

Ghera CM, Benech-Arnold RL y Martinez Ghera MA (1992). The role of fluctuating temperatures in germination and establishment of *Sorghum halepense* (L.) Pers. II. Regulation of germination at increasing depths. *Functional Ecology*, 6: 460-468.

Ghera CM, Martinez Ghera MA y Benech-Arnold RL (1997). The use of seed dormancy to improve grain production. *Journal of Production Agriculture*, 10: 111-117.

Gibson DJ, Millar K, DeLong M, Connolly J, Kirwan L, Wood AJ y Young BJ (2008). The weed community affects yield and quality of soybean (*Glycine max* L.). *Journal of the*

Science of Food and Agriculture, 88: 371-381.

Grundy AC (2003). Predicting weed emergence: a review of approaches and future challenges. *Weed Research*, 43: 1-11.

Grundy AC, Peters NCB y Rasmussen IA (2003). Emergence of *Chenopodium album* and *Stellaria media* of different origins under different climatic conditions. *Weed Research* 43, 163–176.

Grundy AC, Phelps K, Reader RJ, Burston S (2000). Modelling the germination of *Stellaria media* using the concept of hydrothermal time. *New Phytologist*, 148:433-444.

Guglielmini A, Batlla D y Benech-Arnold RL (2007). Bases para el control y manejo de malezas. En: Producción de granos. Bases funcionales para su manejo (Eds E Satorre, RL Benech-Arnold, G Slafer, E de la Fuente, D Miralles, M Otegui, R Savin). Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires. Pp 579-614.

Gummerson RJ (1986). The effect of constant temperatures and osmotic potentials on the germination of sugar beet. *Journal of Experimental Botany*, 37: 729-741.

Gundel PE, Martínez-Ghersa MA, Garibaldi LA y Ghersa CM (2009). Viability of *Neotyphodium* endophytic fungus and endophyte-infected and noninfected *Lolium multiflorum* seeds. *Botany*, 87: 88-96. Doi: 10.1139/B08-119.

Hammerton, JL (1964). Variations in the after-ripening requirement of *Polygonum aviculare* L. seeds. *Proceedings of the British Weed Control Conference*, 7: 628-634.

Harlan JR y De Wet JMJ (1963). Some thoughts about weeds. *Economic Botany*, 19: 16-24.

Hartmann KM (1966). A general hypothesis to interpret “high energy phenomena” of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochemistry and Photobiology*, 5: 349-366.

Hegarty TW (1978). The physiology of seed hydration and dehydration and the relation between water stress and the control of germination: a review. *Plant, Cell & Environment*, 1: 101-119.

Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC y Schäfer E. (2001). Phytochrome E control light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 128: 194-200.

Hilhorst HWM (1995). A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5: 61-73.

Hilhorst HWM (1998). The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. *Seed Science Research*, 8: 77-90.

Hilhorst HWM (2007). Definition and hypotheses of seed dormancy. In: Bradford K, Nonogaki H (Eds). *Seed development, dormancy and germination*, vol 27. Blackwell, Oxford, pp 50-71.

Hilhorst HWM, Derkx MPM y Karssen CM (1996). An integrating model for seed

dormancy cycling: characterization of reversible sensitivity. In: Plant Dormancy (Eds GA Lang) pp. 341-360. (CAB International: Wallingford).

Holm L, Doll J, Holm E, Pancho J y Herberger J (1997). World Weeds: Natural Histories and Distribution. (John Wiley & Sons, Inc: New York).

Huarte R y Benech-Arnold RL (2005). Incubation under fluctuating temperatures reduces mean base water potential for seed germination in several non-cultivated species. *Seed Science Research*, 15: 89-97.

Jensen P (1995). Effect of light environment during soil disturbance on germination and emergence pattern of weeds. *Annals of Applied Biology*, 127: 561-571.

Karssen CM (1980). Patterns of change in dormancy during burial of seeds in soil. *Israel Journal of Botany*, 29: 65-73.

Karssen CM (1982). Seasonal patterns of dormancy in weed seeds. In: *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination*. (Ed A Khan) pp. 243-270 (Elsevier Biomedical Press: Amsterdam).

Karssen CM, Derkx MPM y Post BJ (1988). Study of seasonal variation in dormancy of *Spergula arvensis* L. seeds in a condensed annual temperature cycle. *Weed Research*, 28: 449-457.

Kebreab E y Murdoch A (1999). A quantitative model for loss of primary dormancy and induction of secondary dormancy in imbibed seeds of *Orobanch* spp. *Journal of Experimental Botany*, 50 (331): 211-219.

Khan MA y Ungar IA (1997). Seed germination of *Polygonum aviculare* as influenced by salinity, temperature, and gibberellic acid. *Seed Science and Technology*, 26: 107-117.

Kruidhof H, Bastiaans M, Kropff L y Martin J. (2009): Cover crop residue management for optimizing weed control. *Plant Soil* 318 (1-2), pág. 169–184. DOI: 10.1007/s11104-008-9827-6.

Kruk B y Benech-Arnold RL (1998). Seed thermal responses in knotgrass (*Polygonum aviculare*) and purslane (*Portulaca oleracea*) a functional and quantitative analysis for the construction of predictive models. *Weed Science*, 46: 83-90.

Kruk BC y Benech-Arnold RL (2000). Dormancy and germination responses to temperature in *Carduus acanthoides* and *Anagallis arvensis*, assessed through a screening system: their relationship with field-observed emergence patterns. *Seed Science Research*, 10: 77-88.

Labrada R y Parker C (1996). El control de Malezas en el contexto del Manejo Integrado de Plagas. En Labrada R, Caseley JC y Parker C. Manejo de malezas para países en desarrollo. Estudio FAO. Producción y Protección Vegetal 120. (pp. 3- 9). Roma: FAO.

Lee KP y López-Molina L (2012). Control of seed germination in the shade. *Cell Cycle* 11 (24), pág. 4489–4490. DOI: 10.4161/cc.22667.

Leopold AC, Glenister R y Cohn MA (1988). Relationship between water content and

after-ripening in red rice. *Physiologia Plantarum*, 74: 659-662.

Malavert C, Batlla D y Benech-Arnold RL (2014). Effect of thermal stratification conditions during dormancy release on the rate of induction into secondary dormancy in *Polygonum aviculare* L. seeds. 11<sup>th</sup> Conference of the International Society for Seed Science (ISSS). September 15 – 19, 2014. Changsha, China.

Mandoli DF y Briggs WR (1981). Phytochrome control of two low-irradiance responses in etiolated oat seedlings. *Plant Physiology*, 67: 733-739

Maraghni M, Gorai M y Neffati M (2010). Seed germination at different temperatures and water stress levels, and seedling emergence from different depths of *Ziziphus lotus*. *South African Journal of Botany* 76 (3), pág. 453–459. DOI: 10.1016/j.sajb.2010.02.092.

Marzocca A (1976). Manual de malezas. (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: Buenos Aires).

Merrit DJ, Touchell DH, Senaratna T, Dixon KW y Sivasithamparam K (2003). Water sorption characteristics of seeds of four Western Australian species. *Australian Journal of Botany*, 51: 85-92. Doi:10.1071/BT02040

Meyer SE, Debaene-Gill SB y Allen PS (2000). Using hydrothermal time concepts to model seed germination response to temperature, dormancy loss, and priming effects in *Elymus elymoides*. *Seed Science Research*, 10: 213-223.

Murdoch AJ (1998). Dormancy cycles of weed seeds in soil. *Aspects of Applied Biology*, 51: 119-126.

Murdoch AJ (2004). Seed dormancy. In: Goodman, R.M. (ed.) *Encyclopedia of Plant & Crop Science*. Marcel Dekker, New York, pp. 1130-1133.

Murdoch AJ y Roberts EH (1997). Temperature and the rate of germination of dormant seeds of *Chenopodium album*. In: *Basic and Applied Seed Biology*. (Eds RH Ellis, M Black, AJ Murdoch, TD Hong) pp. 547-553. (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht).

Murdoch AJ, Roberts EH y Goedert CO (1989). A model for germination responses to alternating temperatures. *Annals of Botany*, 63: 97-111.

Neff MM, Fankhauser C y Chory J (2000). Light: an indicator of time and place. *Genes & Development*, 14: 257-27.

Neve P, Vila-Aiub M y Roux F (2009). Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytologist*, 184: 783-793.

Nonogaki H, Bassel GW y Bewley JD (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science*, 179: 574-581.

Oorschot JL, Van P y Straathof HJM (1988). On the occurrence and distribution of chlorplastic resistance of weeds to triazines in the Netherlands. *Proceedings of the VIII international symposium of weed ecology, biology and systematics*, 8 (1): 267-275.

Piskurewicz U, Turečková V, Lacombe E y López-Molina L (2009). Far-red light inhibits

germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *The EMBO Journal* 28 (15), pág. 2259–2271. DOI: 10.1038/emboj.2009.170.

Pons TL (1992). Seed responses to light. In: *Seeds. The ecology of regeneration in plant communities.* (Ed M Fenner) pp. 259-284. (CAB International: Wallingford).

Pons TL (2000). Seed responses to light. In: *Seeds. The Ecology of Regeneration in Plant Communities* (Ed M Fenner). Second Edition. Pp. 237- 259 (CAB Publishing: Wallingford).

Pons TL (1991). Induction of dark dormancy in seeds: its importance for the seed bank in the soil. *Functional Ecology*, 5:669-675.

Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Kelmenson PM, Lazarova GI, Kubota T, Alba RM (1997) The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant, Cell and Environment* 20, 672–677.

Pritchard HW, Tompsett PB y Manger KR (1996). Development of a thermal time model for the quantification of dormancy loss in *Aesculus hippocastanum* seeds. *Seed Science Research*, 6: 127-135.

Probert RJ (1992). The role of temperature in germination ecophysiology. In *Seeds. The ecology of regeneration in plant communities.* (Ed M Fenner) pp. 285-325. (CAB International: Wallingford).

Probert RJ (2000). The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*, 2: 261-292.

Probert RJ, Smith RD y Birch P (1985). Germination responses to light and alternating temperatures in European populations of *Dactylis glomerata* L. IV. The effects of storage. *New Phytologist*, 101: 521-529.

Radosevich DR, Holt J y Ghera CM (2007). *Ecology of weeds and invasive plants. Relationship to agriculture and natural resources management.* 3rd Edition. John Wiley & Sons: Nueva York.

Radosevich S, Holt J y Ghera C (1997). *Weed Ecology. Implications for Management.* (John Wiley & Sons Inc: New York).

Ransom ER (1935). The inter-relations of catalase, respiration, after-ripening, and germination in some dormant seeds of the *Polygonaceae*. *American Journal of Botany*, 22: 815-825.

Salisbury FB y Ross CW (1991). *Plant Physiology.* 4<sup>th</sup> Edition. Wadsworth, Belmont, CA, 459 pp.

Satorre EH y De la Fuente E (2016). Las malezas y la agricultura. En: *Bases y herramientas para el manejo de malezas.* Satorre EH, Kruk BC y De la Fuente E (Eds). Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Pp 11-34.

Scopel AL, Ballaré CL y Radosevich SR (1994). Photostimulation of seed germination during soil tillage. *New Phytologist*, 126:145-152.

Scopel AL, Ballaré CL y Sánchez RA (1991). Induction of extreme light sensitivity in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivations. *Plant, Cell & Environment*, 14: 501-508.

Scursoni JA, Forcella F y Gunsolus J (2007). Weed escapes and delayed weed emergence in glyphosate-resistant soybean. *Crop Protection*, 26: 212-218.

Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M (1996). Action spectra for phytochrome A and phytochrome B specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 8129–8133.

Shinomura T, Uchida K y Furuya M (2000). Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122: 147-156.

Smith H (1982). Light quality, photoperception, and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology*, 33: 481-518.

Soppe WJJ y Bentsink L (2016). Dormancy in Plants. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002045.pub2.

Steadman KJ, Bignell GP y Ellery AJ (2003a). Field assessment of thermal after-ripening time for dormancy release prediction in *Lolium rigidum* seeds. *Weed Research*, 43: 458-465.

Steadman KJ, Crawford AD y Gallagher RS (2003b). Dormancy release in *Lolium rigidum* seeds is a function of thermal after-ripening time and seed water content. *Functional Plant Biology*, 30: 345–35 2.

Górski T, Górski K, y Stasiak H (2013). Inhibition of seed germination by far red radiation transmitted through leaf canopies. *Polish Journal of Agronomy*, 13, 10–38

Tang J, Busso C, Jiang D, Wang Y, Wu D y Musa A (2016). Seed Burial Depth and Soil Water Content Affect Seedling Emergence and Growth of *Ulmus pumila* var. *sabulosa* in the Horqin Sandy Land. *Sustainability* 8 (1), pág. 68. DOI: 10.3390/su8010068.

Taylorson RB (1972). Phytochrome controlled changes in dormancy and germination of buried weed seeds. *Weed Science*, 37: 335-338.

Taylorson RB (1987). Environmental and chemical manipulation of weed seed dormancy. *Review of Weed Science*, 3: 135-154.

Taylorson RB y Hendricks SB (1972). Phytochrome control of germination of *Rumex crispus* L. seeds induced by temperature shifts. *Plant Physiology*, 50: 645-648.

Tester, M. y Morris, C. (1997). The penetration of light through soil. *Plant Cell & Environment*, Volume 10, Issue 4: 281-286.

Thompson K y Grime JP (1983). A comparative study of responses to diurnally-fluctuating temperatures. *Journal of applied Ecology*, 20:141-156.

Thompson K y Whatley JC (1983). Germination responses of naturally-buried weed seeds to diurnal temperature fluctuations. *Aspects of Applied Biology*, 4: 71-77.

Totterdell S y Roberts EH (1979). Effects of low temperatures on the loss of innate dormancy and the development of induced dormancy in seeds of *Rumex obtusifolius* and *Rumex crispus* L. *Plant, Cell & Environment*, 2: 131-137.

Totterdell S y Roberts EH (1981). Ontogenetic variation in response to temperature change in the control of seeds dormancy of *Rumex obtusifolius* L. and *Rumex crispus* L. *Plant, Cell & Environment*, 4: 75-80.

Van Acker RC (2009). Weed biology serves practical weed management. *Weed Research*, 49:1-5.

Van Esso ML, Ghera CM y Soriano A (1986). Cultivation effects on the dynamics of a Johnson grass seed population in the soil profile. *Soil and Tillage Research*, 6 (4): 325-335.

Vazquez-Yanes C y Smith H (1982). Phytochrome control of seed germination in the rain forest pioneer trees *Cecropia obtusifolia* and *Piper auritum* and its ecological significance. *New Phytologist*, 92: 477- 485.

Vegis A (1964). Dormancy in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 15: 185-224.

Vertucci C, Vertucci F y Leopold A (1987). Water content and the conversion of phytochrome regulation of lettuce dormancy. *Plant Physiology*, 84: 887-890.

Vleeshouwers LM (1997). Modelling weed emergence patterns. Ph.D. thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

Vleeshouwers LM y Bouwmeester HJ (2001). A simulation model for seasonal changes in dormancy and germination of seeds. *Seed Science Research*, 11: 77-92.

Vleeshouwers LM y Kropff MJ (2000). Modelling field emergence patterns in arable weeds. *New Phytologist*, 148: 445-457.

Vleeshouwers LM, Bouwmeester HJ y Karssen CM (1995). Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology*, 83: 1031-1037.

Wall JK y Johnson CB (1983). An analysis of phytochrome action in the high irradiance response. *Planta*, 159: 387-397.

Wang WQ, Song SQ, Li SH, Gan YY, Wu JH y Cheng HY (2009). Quantitative description of the effect of stratification on dormancy release of grape seeds in response to various temperatures and water contents. *Journal of Experimental Botany*, 12:397-406.

Washitani I (1987). A convenient screening test system and a model for thermal germination responses of wild plant seeds: behaviour of model and real seed in the system. *Plant, Cell & Environment*, 10: 587-598.