

Pereyra Zorraquín, María del Rosario

*Dormición en semillas de *Dipsacus fullonum* L. : estudio del efecto de la temperatura y de las cubiertas seminales sobre la salida de la dormición primaria*

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Pereyra Zorraquín, M. del R. 2014. Dormición en semillas de *dipsacus fullonum* L : estudio del efecto [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/dormicion-semillas-dipsacus-fullonum.pdf> [Fecha de consulta:.....]

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

*Dormición en semillas de *Dipsacus fullonum* L:*

*Estudio del efecto de la temperatura y de las cubiertas seminales sobre la salida de
la dormición primaria.*

Trabajo Final de Graduación para optar por el título de:

Ingeniero en Producción Agropecuaria

Autor: Pereyra Zorraquín, María del Rosario

Profesor Tutor: Ingeniero Zootecnista (M.Sc., Dr.) Roberto Huarte

Fecha: 01 /10/2014

Nota del Tutor para aprobación de Trabajo Final de Graduación

1^{ro} de Octubre de 2014

Sr. Director de la carrera de IPA

Presente.-

De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., adjuntando el Trabajo Final “*Dormición en semillas de *Dipsacus fullonum* L.: Estudio del efecto de la temperatura sobre la salida de la dormición primaria y de la acción de las cubiertas*”, que ha sido desarrollado por el alumno María del Rosario Pereyra Zorraquín, N^{ro} de Registro 050900633, en cumplimiento de las disposiciones vigentes.

Dicho trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y, habiendo evaluado el mismo, lo considero aprobado con los siguientes comentarios.

Por lo expuesto anteriormente, avalo su presentación ante el Comité Evaluador correspondiente.

Sin otro particular lo saludo atte.

Firma

Aclaración

Cargo Docente IPA

AGRADECIMIENTOS:

Especialmente a mi tutor, Roberto Huarte, por su acompañamiento, dedicación y consejos dados en estos últimos años, y sobre todo en la tesis. Agradezco su predisposición en todo este tiempo.

A la Lic. Margarita Solivella, por su ayuda y apoyo en el desarrollo de los ensayos en el laboratorio.

A mis queridos padres, hermanos y amigos por el apoyo incondicional y permanente que recibí durante toda mi carrera.

A todos aquellos profesores que con esmero y dedicación fueron responsables de mi educación académica, profesional y personal.

A todas aquellas personas que con su ayuda o con su sostén hicieron posible la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	10
Descripción de <i>Dipsacus fullonum</i>	10
Tratamientos pre germinativo	20
Hipótesis	24
Objetivos	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Material vegetal	25
Efecto de las cubiertas de las semillas como causantes de la dormición fisiológica	25
Efecto de diversos tratamientos pre-germinativos sobre las cubiertas vegetales como reguladores de la germinación	26
I. <i>Escarificación química</i>	27
II. <i>Lixiviación</i>	28
III. <i>Escarificación mecánica</i>	28
IV. <i>Estimulantes químicos</i>	29
Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la modulación del nivel de dormición primaria	30
I. <i>Estratificado en frío (Chilling)</i>	31
II. <i>Post-Madurado en seco (After-ripening)</i>	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	32
Efecto de diversos tratamientos pre-germinativos sobre las cubiertas vegetales como reguladores de la germinación	32
Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la modulación del nivel de dormición primaria	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34

Efecto de las cubiertas de las semillas como causante de la dormición fisiológica .	34
Tratamientos pre-germinativos – Efecto de las cubiertas	35
I. <i>Escarificación química</i>	35
II. <i>Lixiviación</i>	38
III. <i>Escarificación mecánica</i>	40
IV. <i>Estimulantes químicos</i>	42
Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la modulación del nivel de dormición primaria	44
I. <i>Estratificado en frío (Chilling)</i>	45
II. <i>Post-Madurado (After-ripening)</i>	47
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.** Germinación acumulada media (%) de *D. fullonum* luego de 21 días de incubación a 15°C. Semillas con luz; en oscuridad y embriones extraídos en condiciones de oscuridad. 34
- Figura 2.** Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas con ácido sulfúrico durante 5', 15', 45', 90' a 15°C en oscuridad. 36
- Figura 3.** Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas con peróxido de hidrógeno 0,89, 44,5 y 89 Molar a 15°C en oscuridad. 38
- Figura 4.** Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas en agua hirviendo por 5, 10, 15 y 20 segundos, incubados a 15°C en oscuridad. 39
- Figura 5.** Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* lijadas 5 veces en su extremo posterior, incubadas a 15 °C en oscuridad. 40
- Figura 6.** Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* lijadas en ambas caras laterales en 5 oportunidades, incubadas a 15°C en oscuridad. 41
- Figura 7.** Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas con nitrato de potasio 0,2% e incubadas a 15°C en oscuridad. 42
- Figura 8.** Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas en Fluridona 10, 50 y 100 µM y 50 µM + GA₃ 50 µM a 15°C en oscuridad. 44
- Figura 9.** Germinación acumulada media (%) de *D. fullonum* luego de 21 días de incubación a 20°C. Tratamientos pre-germinativos durante 0, 4, 8 y 12 semanas. 46
- Figura 10.** Germinación acumulada media (%) de *D. fullonum* luego de 21 días de incubación a 20°C. Tratamientos pre-germinativos durante 0, 4, 8 y 12 semanas. A. Chilling (5°C). B. Post-madurado 15°C. C. Post-madurado 20°C. 49

ÍNDICE DE FOTOS.

Foto 1. Procedimiento de escisión de embriones	35
Foto 2. Cajas de Petri con embriones germinados.	35
Foto 3. Embrión germinado donde se observa la raíz, tallo y cotiledones emergidos.	35
Foto 4. Observación de cubiertas de la semilla y el embrión con su radícula.	35
Foto 5. Embrión germinado, con radícula de 2mm de longitud.	35

RESUMEN.

Dipsacus fullonum (carda) es una maleza muy invasora. Se la suele encontrar en una amplia variedad de suelos, prefiriendo aquellos con alta humedad y pobremente drenados, tolerando muy bien las lluvias excesivas de primavera. Sus hábitats predominantes son campos, pasturas, costados de rutas y caminos, zanjas, terrenos perturbados por el hombre, banquinas, vías y bordes de alambrados. El desarrollo de prácticas de manejo sustentables de malezas requiere de la comprensión de los procesos biológicos que regulan la salida del estado de dormición y la germinación de las semillas. En la actualidad, no se conocen los requerimientos que esta especie tiene para reducir el nivel de dormición primaria y así terminar el estado de dormición, ni la naturaleza de este estado. Por esta razón, se busca comprender ambos procesos. Dentro de este marco teórico se evaluó: i) el rol de las cubiertas sobre la dormición de esta especie mediante la aplicación de diversos tratamientos y ii) la influencia de distintas temperaturas y tiempos de almacenamiento sobre la salida de la dormición. Fue posible concluir que *D. fullonum* presenta dormición fisiológica, siendo la causa la presencia de cubiertas seminales que ejercen un efecto inhibitorio sobre la germinación y no la existencia de un embrión subdesarrollado. Las cubiertas actúan principalmente sobre el Balance Hormonal en la relación entre ABA/GA. Sería posible estimar que tratamientos como escarificación mecánica y química lesiones sobre el embrión; mientras que estimulantes químicos y hormonales promovieron la germinación. El embrión se encontraba completamente desarrollado; ya que tras la escisión embrionaria, se observó un 100% de germinación. Asimismo; las semillas poseían requerimientos de tratamientos pre-germinativos; Chilling (estratificado en

frío) y After-ripening (post-madurado a 15 y 20°C). Los máximos porcentajes de germinación se obtuvieron luego de 8 semanas de estratificado en frío (58%) y luego de 12 semanas de post-madurado en seco a 15°C (55%). Períodos de tiempo mayores o menores; o temperaturas más elevadas pudieron causar el ingreso en un estado de dormición secundaria.

INTRODUCCIÓN.

Descripción de *Dipsacus fullonum*.

Dipsacus fullonum L. (carda/carda silvestre) pertenece a la familia Dipsacaceae. El género *Dipsacus* comprende unas 15 especies originarias de Europa, Asia y Noreste de África; que se han naturalizado en varias provincias argentinas (Burkart, 1957) y en América del Norte (Bentivegna, 2008). Es una maleza muy invasora (Dimitri, 1985); se la suele encontrar en una amplia variedad de suelos; prefiriendo aquellos con alta humedad y pobremente drenados, tolerando muy bien las lluvias excesivas de primavera (Cullen, 2003). Sus hábitats predominantes son campos, pasturas, costados de rutas y caminos, zanjas, terrenos perturbados por el hombre (Di Tomaso, 2013), banquinas, vías y bordes de alambrados (Ghersa y León, 1999). Una serie de trabajos destacan su capacidad invasora y su gran plasticidad adaptativa a diversos tipos de suelos y condiciones ambientales. (Snow, 1953, Hauser, 1963, Helliwell, 1996, Ryder, 1996, Valle Gutiérrez, 1996, Cullen, 2003, Burgueño, 2005, Bentivegna, 2006, Rector *et al.*, 2006, Grismado, 2007, Busso, 2013). Esto se debe principalmente a la expansión horizontal de las hojas de la roseta produciendo sombreado del suelo, las espinas en sus hojas y tallos y una raíz pivotante profunda (Werner, 1972, Bentivegna, 2008). Adicionalmente; *D. fullonum* tolera elevados niveles de salinidad en el suelo (Beaton y Dudley, 2004; 2013). Las rosetas ya establecidas exhiben hojas de una gran extensión, que cubren el suelo reduciendo el espacio y luz disponible para el establecimiento de otras especies (Rector *et al.*, 2006).

En estudios taxonómicos realizados, se encuentra el uso del binomio *D. sylvestris* Hudson (en América del Norte), y *D. fullonum* L. (en Europa y Asia), para la “carda” o “cardo silvestre”. Por otro lado, el binomio *D. fullonum* y *D. sativus* se utiliza para la “carda de cardar” o “carda cultivada” en América del Norte y Europa - Asia, respectivamente (Werner, 1975c). Ferguson y Brizicky (1965) discutieron dicho problema y concluyeron que *D. fullonum* L. es el nombre adecuado para la “carda”. Diversos autores como Werner (1975c), Tophman (1968) y Dimitri (1985), concuerdan que el origen del nombre *Dipsacus* proviene del griego; *Dipsakos*; y éste de *dipsa*: “sed”. En efecto, esta planta recoge agua en las axilas de las hojas inferiores; formando una pequeña “taza”. Además, se solía creer que esas gotas de agua tenían propiedades cosméticas (Tophman, 1968). Diversos autores concuerdan que su introducción en el territorio Americano fue accidental, junto con la “carda de cardar” (*D. sativus*); una especie cultivada para usar sus cabezuelas secas durante el procesamiento de la lana (Hauser, 1963, Werner, 1975c, Busso, 2013); cuyo uso actualmente es obsoleto. También se las emplea para arreglos florales (DiTomaso, 2007), armado de juguetes, por insectos que recolectan polen y néctar y para prevenir la erosión en aquellos lugares donde no hay vegetación de cobertura (Werner, 1972; 1975c). Sin embargo, son especies altamente competitivas, con la capacidad de formar matas densas. Dichas plantas, por la presencia de espinas y su gusto amargo, no sirven como alimento para los animales (DiTomaso, 2007).

El género *Dipsacus* comprende plantas herbáceas bienales, de 0,5 – 2 m de altura, provistas de espinas sobre el tallo y hojas. Presenta hojas basales arrosetadas, caulinares sésiles (Cabrera, 1978). Posee una gruesa raíz pivotante, que generalmente

supera los 75 cm de longitud (Werner, 1975c). Las plantas permanecen en estado de roseta hasta el desarrollo del tallo floral, esto ocurre cuando el crecimiento de la roseta supera los 30 cm de diámetro (Werner, 1975a); generalmente en el segundo año de vida (Di Tomaso, 2007). Desarrollan numerosas ramas laterales (Tophman, 1968), formándose una cabezuela floral terminal en cada rama. Por lo tanto, el número total de inflorescencias por planta dependerá del tamaño de la planta, generalmente entre 3 y 9; con extremos entre 1 y 35 siendo estos casos poco frecuentes (Werner, 1975c). Las flores son pequeñas, de color lila, dispuestas en capítulos cilíndricos de 5-15 cm de largo, protegidas por brácteas más cortas o más largas que el capítulo; páleas del receptáculo rígidas, curvadas en la extremidad (Parodi, 1972). Según observaciones descritas por Werner (1975c), la maduración de las flores dentro de una cabezuela comienza formando un anillo central; que se desplaza hacia arriba y hacia abajo; en lo que se conoce como “anillos de maduración”. Asimismo, fue posible determinar que la alogamia es la forma más común de fertilización (Werner, 1975c). El fruto es un aquenio, rectangular, de 3 -6 mm de longitud y 1 mm de ancho de color gris a marrón, que produce una única semilla (Di Tomaso, 2007). Cada planta produce aproximadamente un total de 3000 semillas. Las semillas alcanzan la madurez sobre la planta madre, y poseen un nivel de germinación entre el 30-80% dependiendo de las condiciones ambientales (Werner, 1975b). La emergencia de las plántulas ocurre tanto en el otoño como en la primavera (Bentivegna, 2008). Las semillas maduras caen en un 99.97% de los casos a una distancia no mayor a 1,5 m alrededor de la planta madre (Werner, 1975b). Leo *et al.* (2013) realizaron ensayos de germinación para evaluar los requerimientos de

estratificación; llegando a la conclusión de que *D. fullonum* no posee dichos requerimientos para incrementar su nivel de germinación. Este resultado concuerda con los obtenidos por Beaton (2007) y Taylor (2009). Por otro lado, (Bentivegna, 2008) no encontró respuesta a las temperaturas alternadas como factor terminador de la dormición. En un ensayo realizado por Werner (1975c); las semillas germinaron luego de 22 días de estar flotando en agua destilada, sin registrarse pérdidas en su viabilidad. Esta característica les brinda la posibilidad de dispersión a lo largo de grandes distancias en el agua. Su dispersión también se ve facilitada por el hombre, animales y vehículos. Como consecuencia de esto, se pueden formar nuevas áreas de desarrollo de esta especie alejadas de donde se encontraban originalmente (Bentivegna, 2008). Además, las semillas pueden sobrevivir durante 6 años enterradas y una vez que la población se ha establecido, pueden persistir por más de 25 años. A diferencia de los antecedentes mencionados, La Greca (2010); informó la existencia de ciertos requerimientos para romper con el estado de dormición en semillas de *Dipsacus fullonum* recolectadas en la Provincia de Buenos Aires. En efecto, en ese estudio fue establecido que para terminar con el estado de dormición se requiere de la exposición a temperaturas alternadas o a la luz. Además, al combinar ambos factores; el total de semillas germinadas fue mayor. Fue propuesto que el rol estimulante de las temperaturas alternadas y la luz vinculados con el incremento en la biosíntesis de Giberelinas (GA) y una menor sensibilidad al ácido absísico (ABA). Bajo condiciones de oscuridad o temperatura constante; las semillas no germinan; por lo que es posible concluir que poseen dormición. Estos requerimientos concuerdan

con muchas otras especies malezas (Benech-Arnold *et al.*, 2000; Batlla y Benech-Arnold, 2010).

La infestación del cultivo con malezas proviene mayormente de la emergencia de plántulas desde el banco de semillas del suelo; (Spitters, 1989; Murdoch, 1998). Muchas de las poblaciones de semillas de especies consideradas como malezas presentan dormición. La dormición es un rasgo adaptativo que optimiza la distribución de la germinación en el tiempo y en el espacio (Bewley y Black, 1994). Es por este motivo, que la comprensión de los procesos biológicos que regulan la salida del estado de dormición y la germinación de las semillas de malezas contribuye con el desarrollo de prácticas de manejo sustentable de estas poblaciones, tanto en cultivos como en pastizales naturales (Bhowmick, 1997; Chauhan y Jhonson, 2008). Una semilla con dormición es aquella que no posee la capacidad de germinar en un período de tiempo determinado bajo condiciones ambientales donde los factores físicos (*i.e.* temperatura, luz/oscuridad, humedad, etc.) sean los adecuados para esta especie (Baskin y Baskin, 2004, Rouhi *et al.*, 2012a). A este estado se lo conoce también como letargo, latencia. El momento en que se desencadenan los mecanismos que permiten que el proceso de germinación tenga lugar (*i.e.* cese del estado de dormición) se deben principalmente al efecto de factores ambientales; como por ejemplo, la luz, temperatura, nitratos o endogenos como las hormonas. La temperatura es el factor ambiental más importante para la salida del estado de dormición en especies templadas; la mayoría de las mismas requieren un período invernal que permita la aliviación del estado de dormición como paso previo a la germinación (Baskin y Baskin, 1988). Schmidt (2000) reconoce diferentes grados de

dormición; considerando en los extremos un nivel leve y en el opuesto un nivel más profundo; pudiendo verse modificado a lo largo del tiempo de vida de la semilla. Diversos autores han realizado diferentes clasificaciones de este estado, muchas de las cuales a pesar de poseer una denominación diferente hacen referencia al mismo estado fisiológico de las semillas. Una manera de clasificarla es según el momento de ocurrencia. Así aparecen los términos dormición primaria; como aquella que se desarrolla durante la maduración de la semilla en la planta madre antes de su dispersión (Bewley, 1997); y dormición secundaria; que ocurre luego de la dispersión de la semilla, inducida por condiciones del medio ambiente desfavorables para la germinación. Un ejemplo de esto ocurre en las leguminosas; que germinan en forma rápida; pero a medida que pasa el tiempo sus cubiertas vegetales se van endureciendo (equivalente a dormición física o dormición impuesta por cubiertas). Asimismo, las semillas se vuelven sensibles a la incidencia de la luz debido a un período de tiempo prolongado de oscuridad (Schmidt 2000). Anteriormente, Harper, (1957, 1977) clasificó la dormición en función del momento de desarrollo; en innata, inducida y forzada. La dormición innata es la que presentan las semillas al momento de su dispersión, término equivalente a dormición primaria. La dormición inducida, equivalente a dormición secundaria, es aquella que presentan las semillas una vez que han perdido la dormición innata; se desarrolla como respuesta a algún factor ambiental. Finalmente, la dormición forzada se debe a que las condiciones ambientales no son las adecuadas para la germinación; se la conoce también como dormición condicional, quiescencia o no-dormición. Otra forma de clasificación emplea como criterio la ubicación del componente de la semilla responsable del

estado de dormición. Según Bewley (1997), el estado de dormición se debe a dos causas principales; dormición impuesta por las cubiertas o dormición exógena de las semillas, que son impermeables al pasaje de agua y oxígeno. La testa, o cubiertas seminales, son un tejido de protección conformado por células muertas cuya función es envolver y proteger al embrión y al endosperma. Dicha restricción impuesta por las cubiertas debe ser superada por el embrión en crecimiento para poder germinar (Wanya, 2010). Las causas principales son resistencia mecánica, impermeabilidad física, inhibidores químicos, sensibilidad a la luz; asociadas con las cubiertas (Schmidt, 2000). En cuyo caso, si el embrión es aislado de dichas cubiertas podrá germinar correctamente. Los tratamientos principales para romper con el estado de dormición son; escarificación, agua caliente, altas temperaturas en seco, fuego, ácido, estratificación en frío o en caliente, luz, algún compuesto químico (Emery, 1987). En segundo lugar, cualquier causa relacionada al embrión; desde aquellos con un desarrollo incompleto o inmaduro, presencias de inhibidores químicos localizados en el embrión, se la conoce como dormición embrionaria o dormición endógena (Schmidt, 2000). La forma más reciente de clasificación de dormición es la propuesta descrita por Baskin y Baskin (2004), quienes utilizaron como referencia el trabajo de Nikolaeva *et al.*(1985). Dicha clasificación fue realizada en base a las características de las cubiertas, morfología del embrión y la respuesta fisiológica a las condiciones ambientales y de temperatura. Comprende cinco clases de dormición; dormición fisiológica, dormición morfológica, dormición morfo-fisiológica, dormición física y dormición combinada, las cuales pueden contener niveles y tipos. Las semillas que se encuentran con dormición fisiológica, están imposibilitadas de germinar debido a

algún mecanismo fisiológico que puede ser interno del embrión, en las cubiertas de la semilla, o del endosperma (Amen, 1968; Baskin y Baskin, 2004). En el caso de la dormición morfológica, el embrión se encuentra subdesarrollado, y necesita alcanzar un tamaño o nivel de desarrollo específico para poder germinar. El embrión necesita un período de tiempo determinado, posterior a la dispersión de la semilla, bajo condiciones favorables para poder crecer y germinar. No necesita de un tratamiento específico de ruptura de dormición. La dormición morfo-fisiológica consiste en una combinación de las mencionadas recientemente. La dormición física, se debe a la impermeabilidad de las cubiertas de la semilla al pasaje del agua; que en muchas ocasiones requiere de algún tipo de tratamiento para romper con el estado de dormición y así será posible que se desencadenen los mecanismos de la germinación. Finalmente; la dormición combinada se caracteriza por dormición fisiológica y escaso desarrollo del embrión. Las semillas deben ser sometidas tanto a un tratamiento de estratificación para la imbibición del agua y luego, algún tratamiento de ruptura de dormición fisiológica para poder germinar (Baskin y Baskin, 2004).

Baskin y Baskin (2004) establecen como uno de los problemas más comunes al momento de realizar algún trabajo de investigación consiste en proveer de una definición y descripción del tipo de dormición de la especie en estudio. Hasta el presente, se desconoce el tipo de dormición que presenta *Dipsacus fullonum*, los requerimientos ambientales específicos para germinar o el efecto de las cubiertas. Empleando como referencia el trabajo realizado por Finch-Savage y Leubner-Metzger (2006) podemos asumir que las semillas de *D. fullonum* carecen de dormición o presentan dormición fisiológica. En ese trabajo se presenta un árbol

filogenético de las semillas basado en la morfología interna del embrión y del endosperma en semillas maduras de angiospermas. El orden Rubiaceae, al cual pertenece *D. fullonum*, presenta el tipo de dormición anteriormente mencionados. Adicionalmente, establece para la familia Dipsacaceae, dormición fisiológica y morfo-fisiológica. La dormición fisiológica es la forma de dormición más abundante tanto en semillas de gimnospermas como de angiospermas; así como también en bancos de semillas de regiones con climas templados (Finch-Savage, 2006). Baskin y Baskin, (2004) diferencian tres niveles de dormición fisiológica; profunda, intermedia y leve o no-profunda. La dormición embrionaria y la dormición por efecto de las cubiertas son ambos componentes de la dormición fisiológica; y es la suma e interacción entre uno y otro lo que determina el nivel de la dormición fisiológica de la semilla en su conjunto (Finch-Savage, 2006). La dormición embrionaria se caracteriza por un bloqueo que inhibe el crecimiento en extensión, por lo que aun en embriones que fueron removidos de las semillas estos no podrán germinar. Por otro lado, la dormición inducida por las cubiertas se caracteriza por un bloqueo producido por dichos tejidos; consecuentemente aquellos embriones a los que se les remuevan las cubiertas podrán desarrollarse y germinar normalmente si las condiciones ambientales son las adecuadas. Finch-Savage y Leubner-Metzger (2006), explican como algunas especies responden a diversos factores que llevan a una pérdida del estado de dormición; el proceso de “post-madurado en seco” ó “after-ripening”, “estratificado en húmedo” ó “chilling”, o inclusive, aquellas especies que responden a ambos. El primer factor hace referencia al almacenamiento de las semillas secas en condiciones de oscuridad, durante un período de tiempo y una temperatura

determinada; factores cuyos parámetros varían entre las distintas especies y su nivel de dormición (Finch-Savage, 2006). Se caracteriza por una disminución en la concentración y sensibilidad a ABA; y un incremento en la sensibilidad a las giberelinas y a la luz; así como también una ampliación en el rango de temperaturas para la germinación de las semillas (Finch-Savage, 2006; Iglesias-Fernández *et al.* 2011). El chilling o estratificado en frío corresponde a semillas hidratadas almacenadas a bajas temperaturas (entre 1 a 10°C) también en oscuridad, durante un cierto período de tiempo. En muchos ambos casos, al finalizar la duración del tratamiento, las semillas expuestas a condiciones favorables germinan normalmente. Dichos procesos de post-madurado y estratificado incrementan la sensibilidad a los factores que estimulan la germinación; y una ampliación de la rango de temperatura de germinación (Iglesias-Fernández, 2011).

Diversos autores consideran la dormición como una característica adaptativa que aporta a la especie con ciertas ventajas al momento de establecerse. Entre ellas, podemos nombrar; la prevención de la germinación bajo condiciones ambientales desfavorables; especialmente para el posterior establecimiento de la plántula (Schmidt, 2000, D'hondt *et al.*, 2010, Hilhorst, 1995); quedando la germinación distribuida en el tiempo (Bewley, 1997). Esto suele ocurrir en situaciones en que al momento de la germinación las condiciones son temporalmente adecuadas para la germinación; sin embargo, se convertirán en condiciones muy duras para la sobrevivencia de la joven plántula (Bonner, 1985; Baskin y Baskin, 1998). En segundo lugar; se estima que la dormición busca maximizar la producción de semillas de la planta adulta resultante (D'hondt *et al.*, 2010). D'hondt *et al.* (2010) propusieron

la protección de las semillas tanto del ataque de patógenos fúngicos; así como también una protección aportada por las cubiertas, a aquellas semillas que fueron ingeridas por algún animal, al pasaje a través del tracto digestivo de los mismos. Es importante resaltar también el beneficio de la dormición con respecto a la formación de bancos de semillas; ventaja acompañada de una menor competencia entre plantas de la misma especie (D'hondt, 2010). Aspecto a resaltar especialmente debido a la característica de la dispersión de las semillas en *D. fullonum* a una distancia no mayor de 1,5 m de la planta madre (Werner, 1975b). Sin embargo, según Bewley (1997), la dormición de las semillas suele ser un aspecto negativo en las especies cultivadas por el hombre, que requieren de una rápida germinación y crecimiento de la plántula. Esto se debe a que semillas que no logran sobreponerse al estado de dormición, no podrán germinar en conjunto en un período de tiempo determinado. No obstante, un cierto nivel de dormición es necesario para prevenir la germinación de los granos antes de la cosecha (Bewley, 1997) o durante su almacenamiento y transporte (Schmidt, 2000).

Tratamientos pre-germinativos:

Son todas aquellas condiciones especiales o procedimientos necesarios de aplicar para romper la dormición de las semillas; previo a su germinación. Su objetivo es alcanzar una rápida y uniforme germinación (Schmidt, 2000).

a) Estratificación: se emplea para romper la dormición fisiológica. Se coloca la semilla entre estratos que conservan la humedad, puede ser arena, turba, vermiculita

(Patiño *et al.*, 1983; Hartmann y Kester, 1977; 1988; Donoso, 1993). En la estratificación fría, se mantienen las semillas a temperaturas entre 4 y 10°C durante 20 a 60 días; mientras que la estratificación cálida la temperatura empleada se encuentra entre 22 y 30°C, por un período de tiempo entre 30 y 60 días. (Patiño *et al.*, 1983; Hartmann y Kester, 1988; Figueroa y Jaksic, 2004). El efecto esperado es una mayor permeabilidad al agua en la testa de las semillas con dormición fisiológica, siendo posible que se lleve a cabo el proceso de imbibición de las mismas. En el caso de semillas con dormición fisiológica; se pueden emplear tanto altas como bajas temperaturas; mientras que para superar el estado de dormición morfofisiológica, se requieren bajas temperaturas (Baskin y Baskin, 1988). No obstante, algunas semillas entran en dormición secundaria debido a la exposición a altas o bajas temperaturas; generalmente en especies anuales invernales (Baskin y Baskin, 1988).

b) Escarificación: es cualquier proceso que rompa, raye o altere mecánicamente o ablande las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases.

Pone fin a la latencia física.

i) Mecánica: consiste en raspar las cubiertas de las semillas con papel de lija, limas o quebrarlas con pinzas.

ii) Química: consiste en remojar las semillas por un período entre 15 minutos a 2 horas en ácidos, como por ejemplo en ácido sulfúrico concentrado. Luego, se escurre el ácido y las semillas se enjuagan con agua. Pueden ser sembradas en forma inmediata o almacenadas por un período de tiempo.

c) Lixiviación: las semillas son remojadas en agua corriente, para poder así remover los inhibidores químicos presentes en la cubierta o para ablandar la testa. El tiempo de remojo varía entre 12, 24, 48 o 72 horas. Se puede realizar en agua a temperatura ambiente, o en agua hirviendo; en cuyo caso se aconseja sembrar la semilla luego de 12 - 24 horas de remojo en agua fría.

d) Dry after-ripening (post-madurado en seco): tiene diversos efectos en las semillas; pudiendo actuar como escape para el estado de dormición. Sin embargo, puede inducir a la dormición física ya que el proceso de secado vuelve a las cubiertas de la semilla más duras e impermeables al agua (Baskin y Baskin, 1988; Taiz y Zeiger, 2010).

e) Combinación de tratamientos: en aquellas especies que presentan más de un tipo de dormición.

f) Hormonas y otros estimulantes químicos: nitrato de potasio, tiourea, etileno, ácido giberélico, citokininas, entre otros.

La dormición es una característica propia de muchas malezas, cuyo mecanismo determina el patrón de germinación y emergencia estacional del banco de semillas que poseen dichas especies. En la actualidad, no se cuenta con información completa referente a las condiciones de salida desde la dormición y germinación en semillas de *Dipsacus fullonum*; y aun en menor medida se conocen las características poblacionales de esta especie en Argentina. Es por esta razón que se busca evaluar el efecto de la dormición en las semillas de dicha especie y sus requerimientos para desencadenar los mecanismos de germinación. Se hará especial énfasis en el efecto de

las cubiertas vegetales mediante diversos tratamientos pre-germinativos que buscan anular su efecto inhibitorio sobre la germinación. Del mismo modo, se busca determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento de las semillas en la aliviación de la dormición primaria de dicha especie. Por lo tanto, este trabajo se llevará a cabo para poder dilucidar el mejor método para romper con la dormición de las semillas de *Dipsacus fullonum*. Esto asimismo busca contribuir a un mayor entendimiento de la ecología de la especie estudiada, así como también asistir en la evaluación del significado del proceso de dormición en sí.

HIPÓTESIS.

Las semillas de *Dipsacus fullonum* presentan dormición fisiológica, producida principalmente por las cubiertas de la semilla. Tratamientos como escarificación, post-madurado en seco, estratificación en frío, tratamiento con estimulantes químicos y la escisión embrionaria, permiten una normal germinación de dichas semillas.

OBJETIVOS.

- I. Identificar el tipo de dormición presente en *D. fullonum*.
- II. Establecer el efecto de las cubiertas en la dormición de semillas de *Dipsacus fullonum*.
- III. Evaluar el efecto de la escarificación química sobre la ruptura de la dormición en semillas de la misma especie.
- IV. Determinar si la escarificación mecánica causa la ruptura de la dormición en semillas de dicha especie.
- V. Evaluar el efecto del nitrato de potasio como estimulante químico en la germinación y su efecto en la ruptura de dormición embrionaria.
- VI. Comprobar si el mantenimiento de la dormición primaria se encuentra vinculado con la síntesis de ABA *de novo* por parte de la semilla.
- VII. Evaluar y comparar el efecto que producen los tratamientos pre-germinativos de estratificación en frío (Chilling) y post-madurado (After-ripening) sobre la germinación y dormición en semillas de *Dipsacus fullonum*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material Vegetal.

Las semillas de *Dipsacus fullonum* fueron recolectadas en enero de 2011 dentro del predio de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UCA (Lat. S. 34°34', Long. O. 58°28'). Después de separar las semillas de la inflorescencia fueron conservadas a una temperatura de 6°C hasta el comienzo de los ensayos.

Efecto de las cubiertas de la semilla como causantes de la dormición fisiológica.

Con el fin de poder diferenciar si la causa de la dormición fisiológica de las semillas se debió al efecto inhibitorio de las cubiertas o a la presencia de un embrión inmaduro; se colocaron en cajas de Petri semillas bajo diferentes condiciones.

Se colocaron las semillas sobre dos discos de papel de filtro en cajas de Petri de 9 cm de diámetro; embebidas con 8 ml de agua destilada. Durante 24 horas, fueron incubadas en oscuridad a una temperatura constante de 15°C. Luego de este período de tiempo, se removieron los embriones bajo el siguiente protocolo. Las cubiertas humedecidas de las semillas se cortaron con un bisturí (Belmed) con una hoja nueva, estéril n° 10 (Xinda) y la ayuda de una pinza y una lupa debido al tamaño pequeño de las semillas. Aquellos embriones cuyas cubiertas fueron removidas sin ocasionarles ningún daño; fueron colocados sobre dos discos de papel de filtro humedecidos con 6 ml de agua destilada dentro de cajas de Petri de

9 cm. de diámetro. Se realizaron 4 repeticiones con 24 semillas cada una; las cuales fueron incubadas durante 9 días a una temperatura constante de 15°C en condiciones de oscuridad (Envueltas en papel de aluminio). La germinación se expresó como el porcentaje acumulado del total de semillas. Simultáneamente, se colocaron semillas sobre dos papeles de filtro con 6 ml de agua destilada bajo condiciones de luz (régimen lumínico de 12 horas por día) (control positivo) y de oscuridad (cubiertas con papel de aluminio) (control negativo), dentro de gabinetes de germinación ajustados a una temperatura constante de 15°C. La germinación fue observada diariamente durante 21 días en el control positivo y al finalizar el experimento para el control negativo. La germinación fue expresada como el porcentaje acumulado del total de semillas; presentando cada valor la media \pm EEM de cuatro repeticiones de 30 semillas cada una.

Efecto de diversos tratamientos pre-germinativos sobre las cubiertas vegetales como estimulantes de la germinación.

Se incubaron semillas de *Dipsacus fullonum* (4 repeticiones con 30 semillas para cada ensayo y tratamiento) en gabinetes de germinación ajustados a una temperatura de 15°C. Asimismo, cada ensayo se llevó a cabo en 2 oportunidades. Para evaluar la germinación las semillas fueron colocadas sobre dos discos de papel de filtro en cajas de Petri de 9 cm. de diámetro y se las hidrató con 8 ml. de agua destilada. Dichas cajas de Petri fueron colocadas dentro de 2 bolsas plásticas de color negro para preservarlas de la luz y así evitar su efecto estimulante en la germinación (La Greca,

2010). La germinación fue observada luego de 21 días de incubación, considerándose a toda semilla cuya radícula excedió los 2 mm de longitud como germinada. Se evaluó la germinación sobre un control positivo (semillas embebidas en agua destilada bajo régimen lumínico de 12 horas por día). Por otro lado se realizó un control negativo incubando las semillas en condiciones de oscuridad. Cuando se consideró necesario, para el tratamiento control positivo, se rehidrató con la misma cantidad de agua que la inicial. La germinación fue observada diariamente durante 21 días. Las semillas con radículas de más de 2 mm de longitud se consideraron como germinadas y fueron removidas de las cajas de Petri.

I. Escarificación química.

Se llevaron a cabo diversos ensayos para investigar si la germinación de las semillas en esta especie se encuentra inhibida por la presencia de una cubierta seminal impermeable.

I.I. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

Se colocaron semillas en ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado durante diversos intervalos de tiempo; 5, 15, 45, 90 minutos. Luego, las semillas fueron enjuagadas en agua corriente y secadas sobre papel absorbente para su posterior incubación y determinar su germinación.

I.II. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El tratamiento consistió en la inmersión de semillas en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de 0,89, 44,5 y 89 M. Se enjuagaron las semillas para su incubación en las condiciones anteriormente mencionadas.

II. Lixiviación.

II.I. Agua hirviendo

Para poder determinar el efecto y la presencia de ciertos inhibidores químicos en la cubierta seminal, se remojaron las semillas en agua hirviendo. Este tratamiento también tiene como objetivo ablandar la testa. El tiempo de remojo de las semillas fue de 5, 10, 15 y 20 segundos. Luego fueron secadas en papel absorbente y colocadas en las condiciones establecidas de incubación para su posterior control de germinación.

III. Escarificación mecánica.

El efecto de la escarificación mecánica de las cubiertas fue estudiado mediante el raspado con lija de papel en dos variantes.

III.I. Lijado en el extremo opuesto al embrión.

Se procedió a raspar las semillas en cinco oportunidades con un papel abrasivo (papel de lija N°200) sobre el extremo posterior. Luego las semillas se colocaron

en sus respectivas cajas de Petri para su incubación bajo las condiciones ya mencionadas.

III.II. Lijado de la superficie completa de las cubiertas.

El tratamiento consistió en el raspaje de las semillas en cinco oportunidades con papel abrasivo (papel de lija N° 200) sobre ambas caras longitudinales. Posteriormente, las semillas fueron incubadas en las condiciones ya establecidas para poder determinar el total de germinación.

IV. Estimulantes químicos.

IV.I. Nitrato de Potasio (KNO_3).

Se incubaron semillas utilizando dosis de 0,2% de nitrato de potasio (KNO_3) (Mérola, 2012; Harty, 1972). Luego fueron colocadas en sus respectivas cajas de Petri en los gabinetes de germinación para poder posteriormente determinar el total de germinación.

IV.II - Fluridona.

Se busca determinar si el mantenimiento de la dormición primaria se encuentra vinculada con la síntesis de ABA *de novo* por las semillas. Las mismas fueron embebidas en tres concentraciones diferentes de Fluridona; (1-meethyl-3-penthy-

5-[3-triuromethyl-(phenil)(-4-(1H)-pyridinone), Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, Kansas, USA); 10, 50 y 100 μM ; debido a su acción como inhibidor en la vía metabólica de la biosíntesis de ABA (Yoshioka, 1998). Adicionalmente, se incubaron semillas embebidas con una dosis de 50 μM de Fluridona y 50 μM de GA₄ (Sigma Chemical Company, ST Louis, MO, USA) para poder conocer el efecto combinado de dicho estimulante químico con la adición de Giberelinas exógenas. La concentración empleada fue determinada utilizando como referencia el trabajo publicado por La Greca (2010). El pH de la solución fue corregido a 6,5.

Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la modulación del nivel de dormición primaria.

El siguiente ensayo tuvo como objetivo evaluar los requerimientos de temperatura y tiempo de almacenamiento que poseen las semillas para la salida del estado de dormición. A las semillas se les realizó el tratamiento de estratificado y post-madurado en seco. Una vez finalizado cada tratamiento, las semillas fueron colocadas en cajas de Petri de 9 cm de diámetro para su incubación en oscuridad a 20°C e hidratadas con 8 ml de agua destilada. El día 21 se efectuó el control de la germinación; siendo consideradas como semillas germinadas aquellas cuya radícula excedió los 2 mm de longitud. La germinación se expresó como el porcentaje acumulado y cada valor representó el valor medio EEM del total de tres repeticiones con 30 semillas cada una.

I. Estratificación en frío (Chilling)

Para comprobar si la exposición a bajas temperaturas reduce el nivel de dormición (*i.e.* una reducción del requerimiento de luz para germinar), se colocaron semillas en medio de dos papeles de filtro hidratados con 10 ml de agua destilada en cajas de Petri de 9 cm de diámetro. Las mismas fueron incubadas a 5 °C, durante cuatro períodos de tiempo; 0, 4, 8 y 12 semanas. Para preservar a las semillas de la luz, las cajas fueron recubiertas con papel de aluminio. Una vez finalizado el tiempo establecido, fueron colocadas en los gabinetes de germinación según las especificaciones anteriormente mencionadas.

II. Post-Madurado en seco (After-ripening):

Para poder establecer el efecto de la temperatura de almacenamiento, se colocaron las semillas bajo dos temperaturas de almacenamiento; 15 °C y 20 °C recubiertas con papel de aluminio para preservarlas de la luz. Dichas semillas fueron almacenadas durante cuatro períodos de tiempo diferentes; 0, 4, 8 y 12 semanas. Una vez completado el tiempo establecido, fueron colocadas siguiendo los procedimientos anteriormente descritos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Efecto de diversos tratamientos pre-germinativos sobre las cubiertas vegetales como reguladores de la germinación.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado (DCA). El efecto de cada tratamiento fue evaluado en cuatro repeticiones, con 30 semillas cada una. El ensayo se llevó a cabo en dos oportunidades. Conjuntamente se realizó un control positivo y un control negativo con igual número de repeticiones en ambas ocasiones que se llevó adelante el ensayo. Se evaluó en forma individual el nivel de significancia de la interacción entre ambos experimentos realizados para evaluar la posibilidad de combinar o no los datos. De acuerdo al resultado obtenido en el Análisis de Varianza; se procedió a la determinación de las diferencias entre tratamientos para las diferentes variables, utilizando el Test HSD de Tukey, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Modelo Estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde Y_{ij} es el valor de la variable respuesta en cada unidad experimental (porcentaje de germinación); μ es la media general (germinación media), α_i representa el efecto de cada tratamiento, y ε_{ij} representa el residuo o error aleatorio que existe dentro de cada tratamiento, entre los individuos.

Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la modulación del nivel de dormición primaria.

Se realizó un diseño factorial con dos factores principales: temperatura de almacenamiento (3 niveles) y tiempo de almacenamiento (4 niveles). En este caso, se buscó evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la salida desde la dormición primaria. El fin fue poder determinar los requerimientos necesarios para aliviar la dormición en semillas de *Dipsacus fullonum*.

Modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} es el total de semillas germinadas en cada caja de Petri; μ es la media general, α_i es el efecto del factor A (tiempo de almacenamiento); β_j es el efecto del factor B (tratamiento pre-germinativo); γ_{ij} es el efecto de la interacción AxB y ε_{ijk} representa el residuo o el error aleatorio dentro de cada unidad experimental.

Análisis estadístico de los datos.

Se busca determinar el efecto del tiempo de almacenamiento y de la temperatura de almacenamiento sobre la germinación. Asimismo, es importante comprobar si existe o no interacción entre ambos factores. Los datos de germinación bajo cada condición experimental y todas las interacciones fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias significativas entre tratamientos fueron detectadas utilizando el test HSD Tukey con un nivel de significancia α de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Efecto de las cubiertas de la semilla como causante de la dormición fisiológica.

El porcentaje de germinación se vio afectado al remover las cubiertas de las semillas e incubar los embriones ($p < 0.0001$). La germinación observada en los embriones incubados fue del 100%; igualando al control positivo (100%) y superando notablemente al control negativo ($2.5 \pm 3.19\%$) (Figura 8). Los resultados obtenidos por Chen *et al.* (2008) señalan que la remoción del endosperma y las cubiertas seminales actúo como estímulo para promover la germinación. Es posible que las cubiertas de la semilla; que son tejidos de origen materno, posean altos contenidos de ABA; y que al remover las mismas, su efecto inhibitor de la germinación desaparezca o que las cubiertas ejerzan una restricción mecánica sobre la emergencia de la radícula. Asimismo, los embriones cuyas cubiertas fueron removidas, absorben una mayor cantidad de oxígeno que aquellos embriones que poseen sus cubiertas intactas (Crocker, 1916).

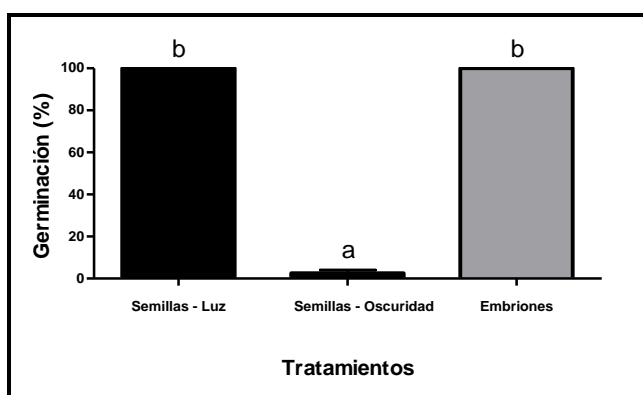
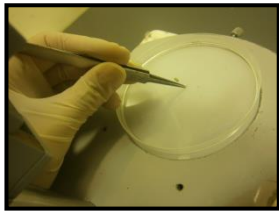


Figura 1: Germinación acumulada media (%) de *D. fullonum* luego de 21 días de incubación a 15°C. Semillas con luz; en oscuridad y embriones extraídos en condiciones de oscuridad. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan las EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$).



1.



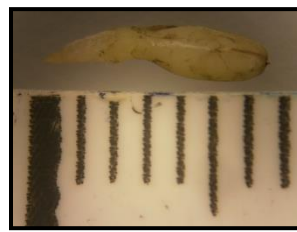
2.



3.



4.



5.

Fotos 1-5: 1. Procedimiento de escisión de embriones. 2. Cajas de Petri con embriones germinados. 3. Embrión germinado donde se observa la raíz, tallo y cotiledones emergidos. 4. Observación de cubierta de la semilla y el embrión con su radícula. 5. Embrión germinado, con radícula de 2 mm de longitud.

Tratamientos pre-germinativos – Efecto de las cubiertas.

I. Escarificación química.

I.I. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

Los datos de germinación se analizaron en conjunto ya que el porcentaje medio de germinación no difirió entre las dos corridas del experimento ($p > 0.99$). La exposición al H_2SO_4 afectó el porcentaje de germinación ($p < 0.0001$) (Figura 1). El porcentaje de germinación de las semillas sumergidas durante 5 minutos fue de $17.95 \pm 3.54\%$ (media \pm EEM) superando al control negativo ($0.4 \pm 1.18\%$) y al resto de los tratamientos (15, 45 y 90 minutos); donde no se registró germinación alguna. No obstante, fue menor al observado en el control positivo ($75 \pm 11.41\%$)

(Figura 1). Si bien la exposición durante 5 minutos incrementó la germinación, este aumento fue inferior al reportado en semillas de diversas familias (Aref *et al.*, 2011; Aliero, 2004; Barekat, 2013; Muhammad, 2003). Estos autores señalaron que el efecto fisiológico promovido por la escarificación con H₂SO₄ se basa en un incremento de la imbibición de agua por las semillas (Nikolaeva, 1977). En *Dipsacus* sin embargo, la ausencia de germinación observada por exposiciones superiores a 5 minutos podría explicarse debido a lesiones en algunas partes vitales del embrión (Aliero, 2004). Msaakpa (2013) destaca el efecto corrosivo del ácido sulfúrico y que al penetrar las cubiertas de la semilla podría matar al embrión. Por este motivo será necesaria la aplicación de este compuesto en tiempos menores a los evaluados.

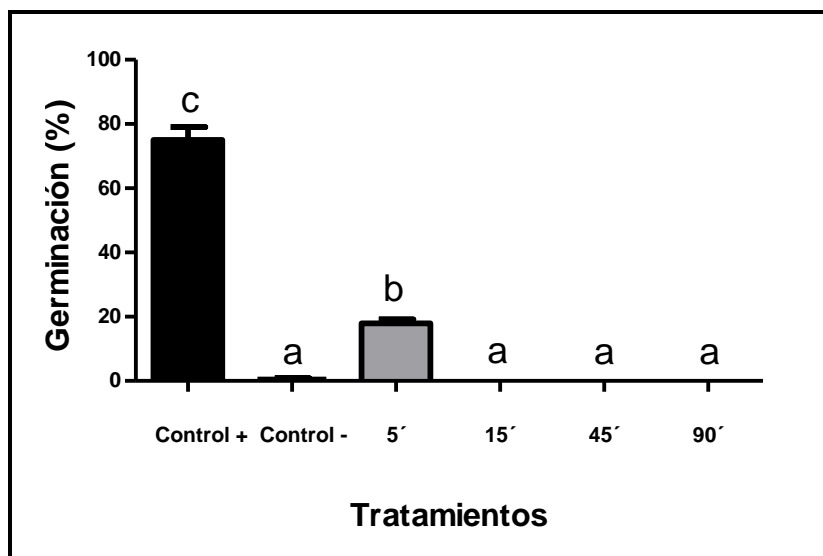


Figura 2. Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas con ácido sulfúrico durante: 5', 15', 45', 90' a 15°C en oscuridad. Control positivo; semillas sin remojar en ácido, a 15°C con luz y control negativo, mismas condiciones en oscuridad. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan las EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$).

I.II. Agua oxigenada (H_2O_2).

Los datos de germinación se analizaron en conjunto al no encontrarse diferencias significativas ($p = 0.66$) en el porcentaje medio de germinación entre las dos corridas del experimento. Las distintas concentraciones de H_2O_2 afectaron el porcentaje de germinación ($p < 0.0001$). En efecto, la presencia de H_2O_2 incrementó la germinación en relación al control negativo ($0.42 \pm 1.18\%$) aunque no alcanzó los valores observados en el control positivo ($75 \pm 11.41\%$). No se registraron diferencias para el porcentaje de germinación total entre semillas tratadas con concentraciones de; 0.89 M de H_2O_2 ($34.59 \pm 29\%$); 44.5 M de H_2O_2 ($38.33 \pm 28.45\%$), ni 89 M de H_2O_2 ($21.67 \pm 17.37\%$) (Figura 2). En muchas especies ha sido comprobado el efecto estimulante de la germinación luego del tratamiento de las semillas con peróxido de hidrógeno (Schmidt, 2000). Chien y Lin (1994) en ensayos con semillas de *Cinnamomum camphorum*, observaron un incremento en el porcentaje de germinación mayor al 40%. Estos resultados son similares a los observados en *Dipsacus fullonum*; donde el porcentaje de germinación en semillas tratadas con H_2O_2 fue notablemente mayor al obtenido para semillas bajo las mismas condiciones ambientales sin tratar. Asimismo, Chien y Lin (1994) concluyeron que dichos resultados se debían al efecto del peróxido en la liberación del estado de dormición física de las semillas. Es posible que intervenga en la oxidación de los factores inhibidores de la germinación presentes en las cubiertas; promoviendo la germinación de las semillas (Ogawa, 2001)

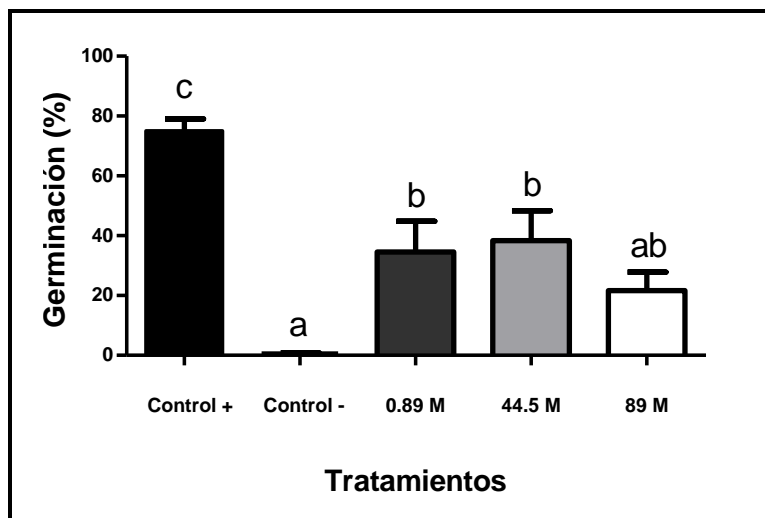


Figura 2. Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas con peróxido de hidrógeno 0,89, 44,5 y 89 Molar a 15°C en oscuridad. Control positivo; semillas sin remojar, a 15°C con luz y control negativo, mismas condiciones en oscuridad. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan las EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$).

II. Lixiviación.

II.I. Agua hirviendo (H_2O 100°C)

Al no diferir el porcentaje medio de germinación entre las dos corridas del experimento ($p = 0.98$), los datos de germinación se analizaron en conjunto. Remojar las semillas en agua hirviendo no incrementó el porcentaje de germinación con relación al control negativo ($0.42 \pm 1.18\%$) ($p < 0.0001$). No se registró germinación alguna para los distintos períodos de tiempo (5, 10, 15 y 20 segundos) de remojo (Figura 3). El porcentaje de germinación fue máximo para el control positivo ($75 \pm 11.41\%$). Estos resultados concuerdan con aquellos presentados por Waidyanatha (1976); donde el tratamiento con agua hirviendo produjo una depresión en la germinación y dicho efecto se incrementa al

extenderse el tiempo del tratamiento. Sin embargo, en ensayos llevados a cabo por Abubakar (2013a), Aliero (2004) y Aref *et al.* (2011); semillas tratadas con agua hirviendo alcanzaron porcentajes de germinación más elevados con respecto a semillas sin tratar (control). Esto se debe principalmente a una reducción en la dureza y/o a cambios fisiológicos en las cubiertas seminales; incrementando el porcentaje y la tasa de germinación (Abubakar, 2013a; 2013b). Es posible que estas diferencias observadas con respecto a las semillas de *D. fullonum* se deban a una menor dureza de sus cubiertas. Según Abubakar (2013b); el porcentaje de germinación disminuye cuando las semillas son colocadas en agua hirviendo durante un largo período de tiempo, posiblemente debido a que el contacto del embrión con agua hirviendo pudiera dañarlo o lesionarlo.

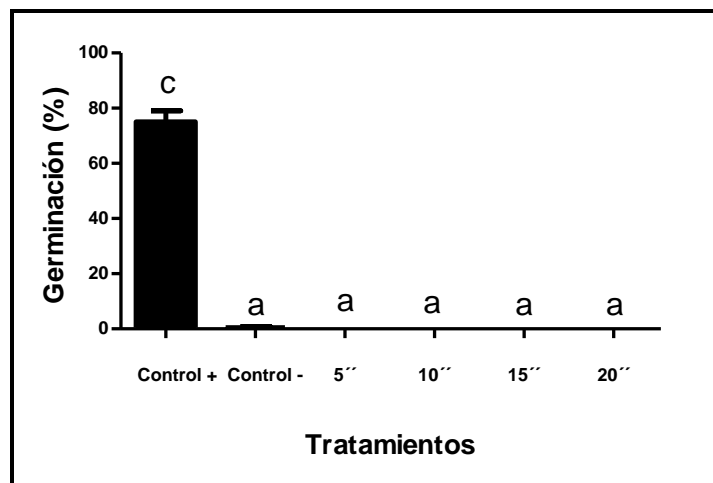


Figura 4. Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas en agua hirviendo por 5, 10, 15 y 20 segundos, incubados a 15°C en oscuridad. Control positivo; semillas sin remojar, a 15°C con luz y control negativo, mismas condiciones en oscuridad. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan las EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$).

III. Escarificación mecánica.

III.I. *Lija extremo posterior.*

Al no haber diferencias en el porcentaje medio de germinación entre las dos corridas del experimento ($p = 0.92$), se combinaron los datos de germinación. El porcentaje de germinación se vio afectado al lijar el extremo posterior del embrión ($p < 0.0001$); alcanzado un valor intermedio entre los dos controles ($13.81 \pm 6.22\%$). La germinación registrada en este tratamiento superó al tratamiento control negativo ($0.42 \pm 1.18\%$); sin embargo, fue inferior a la observada en el tratamiento control positivo ($75 \pm 11.41\%$) (Figura 4). No se ha encontrado bibliografía donde se realice este tratamiento bajo las mismas condiciones.

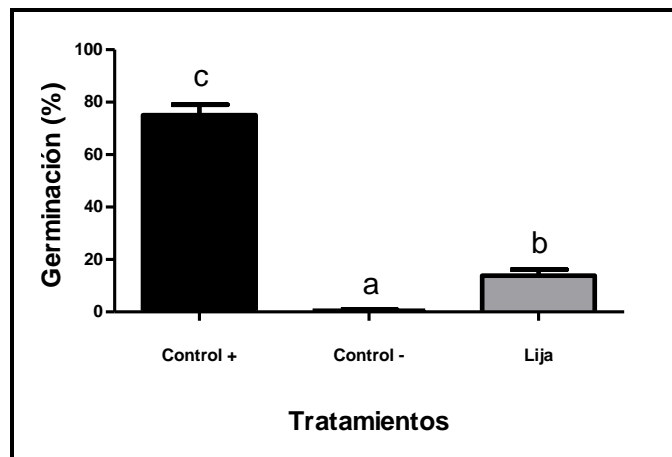


Figura 5. Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* lijadas 5 veces en su extremo posterior, incubadas a 15 °C en oscuridad. Control positivo; semillas sin lijar, a 15°C con luz y control negativo, mismas condiciones en oscuridad. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan las EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$).

III.II. Lija ambas caras.

Los datos de germinación se analizaron en conjunto ya que el porcentaje medio de germinación no difirió entre las dos corridas experimentales ($p = .92$). Al lijar las cubiertas seminales en ambas caras laterales, se afectó el porcentaje de germinación ($p < 0.0001$). El porcentaje de germinación de las semillas lijadas, fue de $9.05 \pm 6\%$ (media \pm EEM), sin diferenciarse significativamente del tratamiento control negativo ($0.42 \pm 1.18\%$) (Figura 5). Estos resultados fueron menores al observado en el control positivo ($75 \pm 11.41\%$). Esta respuesta difiere de la registrada por Ali, *et al.* (2011); donde el tratamiento con papel de lija fue muy efectivo en producir la ruptura de la dormición impuesta por las cubiertas.

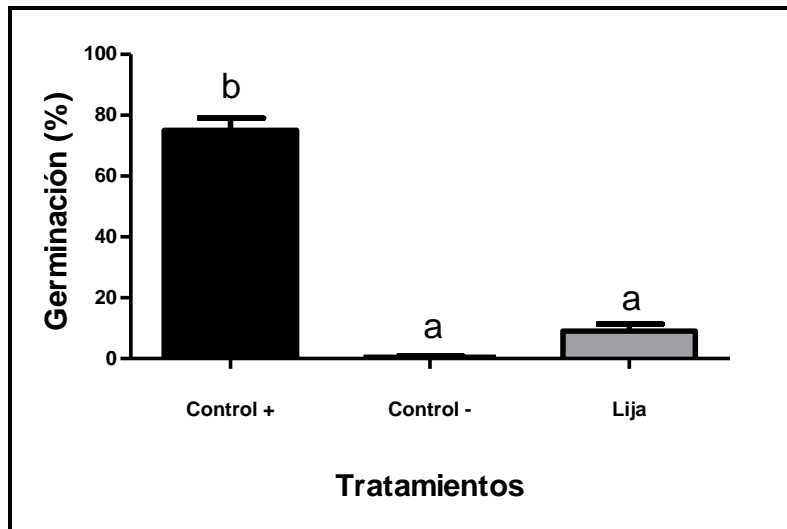


Figura 6. Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* lijadas en ambas caras laterales en 5 oportunidades, incubadas a 15°C en oscuridad. Control positivo; semillas sin lijar, a 15°C con luz y control negativo, mismas condiciones en oscuridad. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan las EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$).

IV. Estimulantes químicos.

IV.I. Nitrato de Potasio (KNO_3).

El porcentaje medio de germinación no difirió entre las dos corridas del experimento ($p = 0.88$); por lo tanto, los datos de germinación se analizaron en conjunto. El tratamiento con KNO_3 afectó el porcentaje de germinación ($p < 0.0001$). El KNO_3 estimuló la germinación hasta valores intermedios a los hallados en ambos controles; registrándose una germinación de $30 \pm 11,68\%$; superior al control negativo ($0.42 \pm 1.18\%$) (Figura 6). Sin embargo, fue menor a la observada en el control positivo ($75 \pm 11.41\%$). Estos resultados concuerdan con aquellos registrados por Shanmugavalli (2007) y Sierra Villagrana, (2005); donde las semillas tratadas con KNO_3 mejoraron los niveles de germinación pero sin poder ser considerados verdaderos éxitos. En cambio difieren de los registrados por Ali *et al.* (2011), donde en semillas tratadas con KNO_3 , no se observaron incrementos en el porcentaje de germinación.

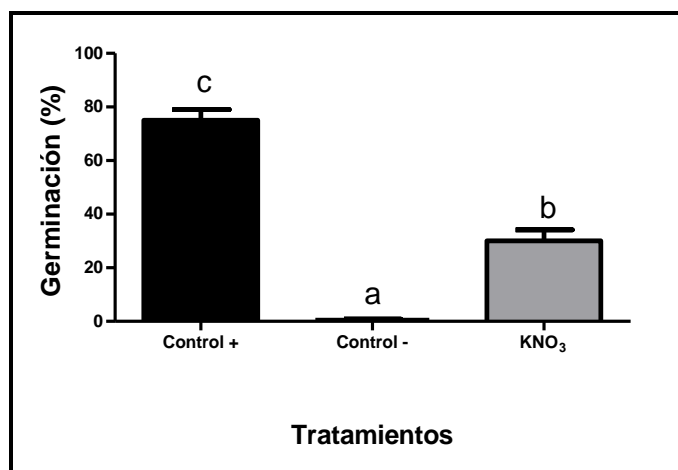


Figura 7. Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas con nitrato de potasio 0,2% e incubadas a 15°C en oscuridad. Control positivo; semillas sin remojar, a 15°C con

luz y control negativo, mismas condiciones en oscuridad. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan las EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$).

IV.II - Fluridona.

Los datos de germinación se analizaron en conjunto ya que el porcentaje medio de germinación no difirió entre las dos corridas experimentales ($p = 0.09$). Al tratar las semillas con Fluridona se incrementó la germinación en relación con el control negativo ($p < 0.0001$). No se diferenciaron en el porcentaje de germinación semillas tratadas con concentraciones de; 10, 50 y 100 μM de Fluridona ($38.57 \pm 22.02\%$; $35.42 \pm 24.23\%$ y $25.83 \pm 15.40\%$) (Figura 7). Por su parte; en el tratamiento control positivo se observó el mayor porcentaje de germinación ($75 \pm 11.41\%$) (Figura 7). Estos resultados señalarían que la síntesis de ABA *de novo* podría estar involucrada en el mantenimiento de la dormición en esta especie. Estos resultados concuerdan con numerosos autores (Goggin *et al.*, 2009; Le Page-Degivry, 1989; 1990, Schiff, 1979). El efecto estimulante en la germinación se debe a la inhibición en la vía metabólica de la síntesis de ABA. El uso de la solución combinada de Fluridona con GA no fue eficaz en incrementar la germinación ($8.33 \pm 8.10\%$). En efecto, la aplicación con GA buscó promover la liberación del estado de dormición. Goggin *et al.* (2009), determinaron como la aplicación de Fluridona y GA en conjunto tuvo efectos levemente estimulantes sobre la germinación. En primer lugar, esto es posible ya que la acción de GA se vio enmascarada por el efecto de la Fluridona sobre la vía metabólica de los carotenos (pasos en común para la síntesis de ABA y de GA). Es importante

destacar que estos resultados coinciden con los obtenidos por La Greca (2010), donde el efecto de la adición exógena de Giberelinas sólo era efectivo bajo un régimen de temperaturas alternas. Por lo tanto, es posible estimar que el nivel de germinación obtenido para este ensayo se deba únicamente a la acción de la Fluridona. Asimismo, es posible que la síntesis de Giberelinas no esté vinculada con la terminación de la dormición en sí; sino que su acción se limite a estimular la elongación de la radícula durante el proceso de germinación (Hilhorst, 1992).

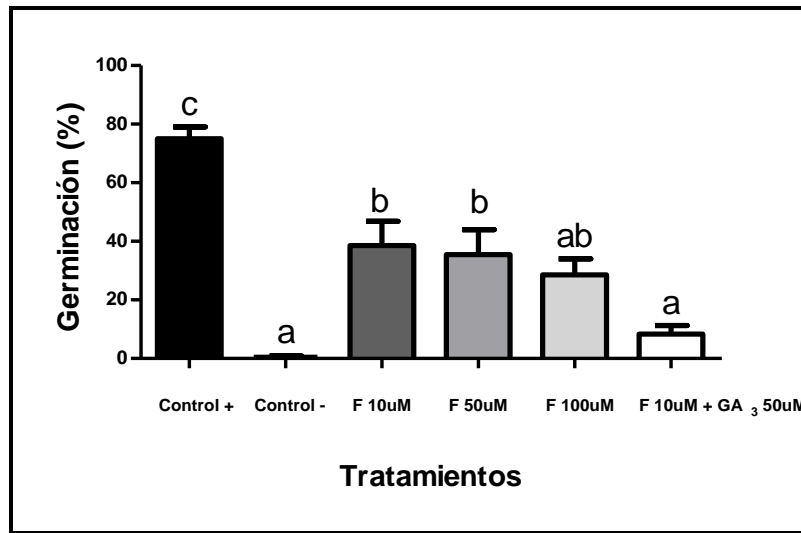


Figura 8: Germinación acumulada media (%) de semillas de *D. fullonum* remojadas en Fluridona 10, 50 y 100 μM y 50 μM + GA₃ 50 μM a 15°C en oscuridad. Control positivo; semillas sin remojar, a 15°C con luz y control negativo, mismas condiciones en oscuridad. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan las EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la modulación del nivel de dormición primaria.

La interacción entre los efectos principales; temperatura y tiempo del tratamiento pre-germinativo sobre la germinación fue significativa ($p < 0.0001$) (Figura 9).

I. Estratificación en frío (Chilling)

El porcentaje de germinación en semillas incubadas luego de ser almacenadas a una temperatura media de 5°C, fue aumentando al hacerlo el tiempo de almacenamiento para 4 y 8 semanas ($43.3 \pm 18.56\%$ y $57.78 \pm 5.09\%$, respectivamente) (Gráfico 9.A). Al extender el tiempo de almacenamiento a 12 semanas, el porcentaje de germinación sufrió una abrupta caída ($2.22 \pm 3.85\%$) (Gráfico 9.A). Esto se debe posiblemente a una inducción de las semillas al estado de dormición secundaria. Semillas no estratificadas no germinaron (Gráfico 10.A). Los resultados aquí presentados difieren de los publicados por diversos autores como Werner (1977), Solecki (1989) y Bentivegna (2008) quienes no hallaron en poblaciones norteamericanas de *D. fullonum* requerimientos de un período de estratificación. Sin embargo, Stolp (2006), en un ensayo en *D. lacinatus*, luego de 9 semanas de estratificado obtuvo no sólo mayores porcentajes de germinación en un menor período de tiempo; sino que también plantas de mayor crecimiento en altura al compararlas con aquellas germinadas sin un tiempo de almacenamiento. Estos resultados concuerdan con el ensayo realizado, donde el mayor porcentaje de germinación se obtuvo luego de 8 semanas. De

acuerdo con cada especie, el tiempo de estratificación necesario varía desde días a meses; registrándose diferencias entre especies, poblaciones dentro de la misma especie e inclusive entre semillas de una misma población (Baskin y Baskin, 2004; Batlla *et al*, 2004). Estos resultados señalan que la germinación puede ocurrir tanto en la primera como en la segunda primavera posterior a la floración en coincidencia con lo expuesto por Werner (1977). Por el contrario, las semillas serían incapaces de germinar en el otoño mismo en que fueron producidas. Asimismo concuerdan con Hubbell (1979) quien señaló la posibilidad de las semillas de *D. fullonum* de permanecer durante un año en estado de dormición y germinar la primavera siguiente.

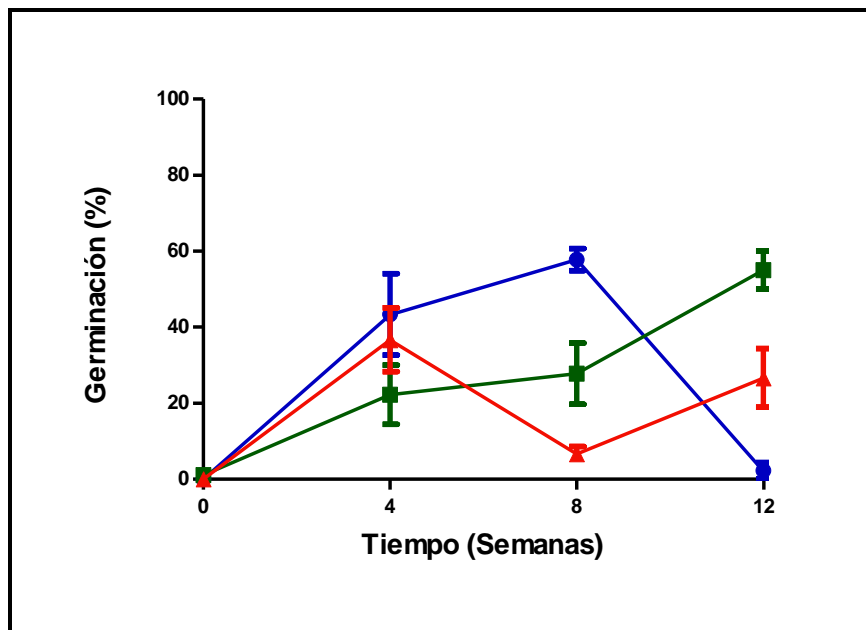


Figura 9: Germinación acumulada media (%) de *D. fullonum* luego de 21 días de incubación a 20°C. Tratamientos pre-germinativos durante 0, 4, 8 y 12 semanas. Diferentes colores indican cada tratamiento; azul: Chilling (5°C); verde: Post-maturation 15°C; rojo: Post-maturation 20°C. Barras T ubicadas representan las EEM.

II. Post-Madurado en seco (Dry after-ripening):

Bajo condiciones de almacenamiento a 15°C; se observó un incremento en el porcentaje de germinación; a medida que el tiempo de almacenamiento fue mayor (Figura 10 B). Los valores observados (media \pm EEM) fueron; 1.11 \pm 1.92% para 0 semanas; 22.22 \pm 13.44% para 4 semanas; 27.77 \pm 13.88% para 8 semanas y 55% \pm 7.07 para 12 semanas (Figura 9.B). Este incremento en el porcentaje de germinación podría estar originado en que durante el almacenamiento en seco; las semillas atraviesan ciertos cambios fisiológicos, que generalmente se reflejan en una reducción en el estado de dormición (Wanya, 2010). En muchas especies, dichos cambios consisten en una disminución en el contenido de ABA, y la intensificación en la sensibilidad de las semillas a factores promotores de la germinación, como la luz, y Giberelinas (Iglesias-Fernández *et al.*, 2011). También es posible observar interacción positiva entre el tiempo de almacenamiento y el porcentaje de germinación obtenido para una temperatura de 15°C.). Para una temperatura de almacenamiento de 20°C en seco, si bien se observó un incremento en el porcentaje de germinación luego de 4 y 12 semanas con un 36.67 \pm 14.53% y 26.67 \pm 13.34% de germinación; respectivamente (media \pm EEM) (Gráfico 10.C). Sorpresivamente, luego de 8 semanas de almacenamiento se registró una caída en el porcentaje de germinación (6.66 \pm 3.34) (Gráfico 9.C) sin encontrar un argumento que explique esta caída en la fracción germinada. Cuando las semillas fueron incubadas sin un tiempo de post-madurado, no se registró germinación (0% para 0 semanas). Es posible que las semillas que perdieron el estado de dormición primaria se les induzca el estado de

dormición secundaria debido a ciertas condiciones desfavorables como luz inadecuada, anoxia, presencia de nitratos o temperaturas. Asimismo, se plantea la posibilidad de una inducción al estado de dormición secundaria por efecto de un incremento en la concentración de ABA (Wanyan, 2010); como también una reducción en la concentración y una disminución en la sensibilidad a GA (Leymarie *et al.*, 2008). En el banco de semillas del suelo, el estado de dormición secundaria posibilita el ciclo de las diferentes intensidades de dormición; que progresivamente pueden ser adquiridas o perdidas; hasta que finalmente se desencadene el proceso de germinación y establecimiento de la plántula, bajo condiciones ambientales favorables (Baskin y Baskin, 1998; Hilhorst, 2007). Bentivegna (2008); obtuvo en 2004 un 24.3 y en 2005 un 20% de germinación en *D. fullonum*, luego de 8 y 12 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente (18–22°C).

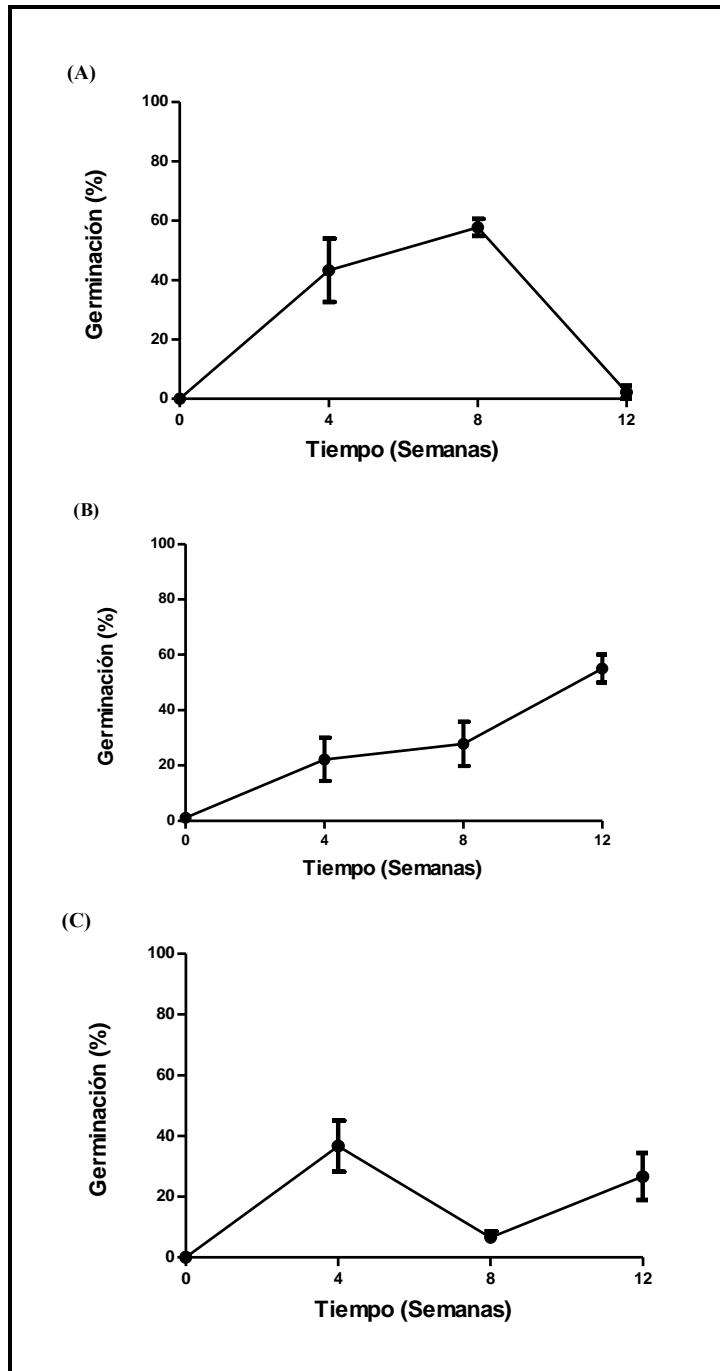


Figura 10: Germinación acumulada media (%) de *D. fullonum* luego de 21 días de incubación a 20°C. Tratamientos pre-germinativos durante 0, 4, 8 y 12 semanas. **A.** Chilling (5°C). **B.** Post-maturation 15°C. **C.** Post-maturation 20°C. Barras T ubicadas representan las EEM.

CONCLUSIONES.

Como resultado de los ensayos realizados, ha sido posible observar que las poblaciones experimentadas exhiben un nivel de dormición fisiológica en las semillas de *Dipsacus fullonum*. Como se estimaba inicialmente, la causa de la imposibilidad o el retardo en la imbibición de agua eran las cubiertas seminales y no un embrión subdesarrollado. Fue posible considerar la validez de dicha conclusión al germinar la totalidad de los embriones cuyas cubiertas fueron removidas.

Las cubiertas seminales ejercen un efecto inhibitorio sobre la germinación, siendo dicho efecto de origen hormonal y no una restricción mecánica. Esto ha sido posible observarlo ya que, aquellos tratamientos como la escarificación mecánica y química (tratamientos con ácido, peróxido de hidrógeno, agua hirviendo y lijado) no sólo no lograron incrementar el porcentaje de germinación, sino que además se cree que produjeron lesiones sobre el embrión.

Por otro lado, estimulantes químicos y hormonales como nitrato de potasio y Fluridona fueron más efectivos promoviendo la germinación en dicha especie. Sin embargo, cierto efecto inhibitorio de las cubiertas permanece al observarse un menor porcentaje de germinación con respecto a aquellas semillas incubadas sin que se les realice tratamiento alguno y estuvieron bajo el efecto estimulante de la luz. El tratamiento con Fluridona promovió la germinación de las semillas al inhibir la vía metabólica de ABA e impedir la síntesis *de novo* de dicha hormona por parte de la semilla.

Las cubiertas seminales actúan sobre el balance hormonal. Una baja relación de ABA/GA estimula la germinación. Como se pudo observar en las semillas remojadas con Fluridona.

Las semillas de *Dipsacus fullonum* poseen requerimientos de post-madurado. Los tratamientos pre-germinativos de Chilling durante 8 semanas y After-ripening a 15°C durante 12 semanas fueron los más eficaces para promover el cese del estado de dormición y estimular la germinación. Luego de 12 semanas de estratificado en frío; las semillas reingresaron en un estado de dormición secundaria. Sería necesario evaluar el nivel de germinación luego de tratamientos pre-germinativos durante períodos de tiempo mayores (*i.e.* durante un año), para poder concluir en forma más acertada el reingreso en el estado de dormición secundaria o no bajo diferentes condiciones.

En el banco de semillas del suelo, el estado de dormición secundaria posibilita el ciclo de diferentes intensidades de dormición, hasta que se desencadene el proceso de germinación. Siendo por lo tanto, un factor esencial a tener en cuenta para su control.

La luz es el mejor estimulante de la germinación. Su rol fisiológico es el incremento en el potencial de crecimiento del embrión (EGP), un debilitamiento del endosperma micropilar o ambos. Esto lleva a un incremento en el contenido endógeno de GAs y una mayor sensibilidad a las GAs aplicadas exógenamente.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abubakar, Z. A.; Muhammad, A.** (2013a) "Breaking seed dormancy in Tamarind (*Tamarindus indica*) a case study of gombe local government area." Journal Appl. Science Environmental Management. **17** (1) 83-87.
- Abubakar, Z. A.; Maimuna, A.** (2013b) "Effect of hydrochloric acid, mechanical scarification, wet heat treatment on germination os seed of *Parkia biglobosa* African Locust Bean (Daurawa) Case study of Gombe local government area." Journal Appl. Environmental Management. **17** (1) 119-123.
- Aliero, B.L.** (2004) "Effects of sulphuric acid, mechanical scarification ans wet heat treatments on germination of seeds of African locust bean tree, *Parkia biglobosa*" African Journal of Biotechnology. **3** (3) 179-181.
- Amen, R. D.** (1968). "A Model of Seed Dormancy." Botany Review **34**: 1-31.
- Aref, I. M.; Atta, H. A. E. A.; Shahrani, T. A.; Mohamed, A.I.** (2011). "Effects of seed pretreatment and seed aource on germination of live *Acacia* spp." African Journal of Biotechnology **10** (71): 15901-15910.
- Ali, H. H.; Tanveer, A.; Nadeem, M. A.; Asghar, H. N.** (2011). "Methods to break seed dormancy of *Rhynchosia capitata*, a summer annual weed." Chilean Journal of Agricultural Research. **71** (3) 483-487.
- Barekart, T.; Otroshy, M.; Samsam-Zadeh, B.; Sadr-arhami, A.; Mokhtari, A.** (2013). Journal of Novel Applied Sciences **2** (10) 513-516.
- Baskin, C. C.; Baskin., J. M.** (1988). "Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region." American Journal of Botany **75**(2): 286-305.
- Baskin, C.C.; Baskin, J.M.** (1998). "Seeds: Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination." Academic Press, San Diego.
- Baskin, J. M.; Baskin, C. C.** (2004). "A classification system for seed dormancy." Seed Science Research **14**(01): 1-16.
- Batlla, D.; Kruk, B.C.; Benech-Arnold, R.L.** (2004). "Modelling changes in dormancy in weed soil seed banks: Implications for the prediction of weed emergence." In: Benech-Arnold, R.L.; Sanchez, R.A., eds. *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*. New York, NY, USA. Food Product Press ans the Haworth Reference Press, 245-270.
- Batlla, D.; Benech-Arnold, R.L.** (2010) "Predicting changes in dormancy level in natural seed soil banks." Plant Molecular Biology **73**, Pag 3-13.
- Beaton, L. L. Dudley., S.A.** (2004). "Tolerance to salt and manganese in three common roadside species. ." International Journal Plant Science **165**(1): 37-51.
- Beaton, L. L. y. Dudley., S.A.** (2007). "The impatc of solute leaching on the salt tolerance during germination of common roadside plant *Dipsacus fullonum* subsp. *sylvestris* (Dipsacaceae)." International Journal Plant Science **168**(3): 317-324.
- Beaton, L. L. Dudley., S.A.** (2013). "Tolerance of roadside and old field populations of common teasel (*Dipsacus fullonum* subsp. *sylvestris*) to salt and low osmotic potentials during germination". AoB Plants. **5**: 11.
- Benech-Arnold R.L.R.; Sánchez, R.A.; Forcella, F.; Kruk, B.C.; Ghersa, C.M.** (2000). "Environmental control of dormancy in weed seed soil banks." Field Crops Research. **67**, 105-122.

- Benech-Arnold, R. L. R., M.V.; Batlla, D.** (2012). "Aspects of the Physiology of Seed Dormancy in Relation to Its Implications in Agriculture. Buenos Aires, Argentina", CONICET - Universidad de Buenos Aires: 13.
- Bentivegna, D. J.** (2006) "Biology and management of cut-leaved teasel (*Dipsacus lacinatus* L.) in central Missouri." (Thesis Master in Science) University of Missouri - Columbia.
- Bentivegna, D. J.** (2008). "Integrated management of the invasive weed, cut-leaved teasel (*Dipsacus lacinatus*) along a Missouri Highway." (Thesis Doctor of Philosophy) University of Missouri - Columbia (2008).
- Bewley, J. D.; Black, M.** (1994). "Cellular events during germination and seedling growth." Seeds: Physiology of Development and Germination. New York, Plenum Press: 175-235.
- Bewley, J. D.** (1997). "Seed germination and dormancy." The Plant Cell **9**: 1055-1066.
- Bhowmick, P. C.** (1997). "Weed Biology. Importance to weed management." Weed Science **45**: 349-356.
- Burgueño, G. Gómez, M.I.; Smolko, L.; Tagliaferro, M.** (2005). "Un estudio de la vegetación de la llanura aluvial de la Reserva Natural Otamendi y su relación con factores ambientales." Informe para Parques Nacionales, Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales: 26.
- Busso, C. A. Bentivegna, D. J.; Fernández, O. A.** (2013). "A review on invasive plants in rangelands of Argentina." Interciencia **38**: 95-103.
- Burkart, A.** (1957). "Las Dipsacaceas asilvestradas en la Argentina." Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, **6**, 243-247.
- Bonner, F. T.** (1989) "Estimating seed viability with seed leachate conductivity. Problems and possibilities." In: Worrall, J.; Loo-Dinkings, J.; Leister, D. P. (Eds.) "Proceedings of 10th North American Forest Biology Workshop on Physiology and Genetics of reforestation." University of British Columbia, Vancouver, B. C. 335-341.
- Cabrera, A. J. Z., E.M.** (1978). "Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires." Santa Magdalena 635, Buenos Aires, Argentina.
- Chauhan, B. S.; Johnson, D.E.** (2008). "Seed Germination and Seedling Emergence of Nalta Jute (*Corchorus olitorius*) and Redweed (*Melochia concatenata*): Important Broadleaf Weeds of the Tropics." Weed Science **56**(6): 814-819.
- Chen, S-H.; Kuo, S-R.; Chien, C-T.** (2008). "Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds." Tree Physiology **28**, 1431-1439.
- Ching-Te Chien y Tsan-Piao Lin** (1994). "Mechanism of hydrogen peroxide in improving germination of *Cinnamomum camphora* seed." Seed Science and Technology **22**, 231-236.
- Crocker, W.** (1916). "Mechanics of Dormancy in Seeds." American Journal of Botany **3**(3): 99-120.
- Cullen, J. M. Briese, D.T.; Kriticos, D.J.; Lonsdale, W.M.; Morin, L.; Scott, J.K.** (2003). "Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds.", CSIRO Entomology: 648.

- D'hondt, B. B., R.; Hoffmann, M.** (2010). "The incidence, field performance and heritability of non-dormant seeds in white clover (*Trifolium repens* L.)." Seed Science Research **20**(03): 169-177.
- Dimitri, M. J. y. O., E.N.** (1985). "Tratado de morfología y sistemática vegetal.", Santa Magdalena 635, Buenos Aires, Argentina, Acme S.A.C.I.: 344-345.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.** InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Di Tomaso, J. M. H., E.A.** (2007). "Weeds of California and other Western States." 1808.
- Di Tomaso, J. M. K. E. A.** (2013). "Weed Control in Natural Areas in the Western United States." Weed Research and Information Center, University of California: 544.
- Donoso, C.** (1993). "Bosques templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica." Editorial Universitaria. Santiago de Chile. 483.
- Emery, D. E.** (1987). "Seeds propagation of native California plants." Santa Barbara botanic Garden, Santa Barbara, C.A.
- Ferguson, I.K.; Brizicky, G.K.** (1965). "Nomenclatural notes on *Dipsacus fullonum* and *Dipsacus sativus*." J. Arnold Harvard University. **46**, 362-365.
- Figueroa, J.; Jaksic, F.** (2004). "Latencia y banco de semillas en plantas de la región mediterránea de Chile central." Revista Chilena de Historia Natural. **77**: 201-215.
- Finch-Savage, W.E. Leubner-Metzger, G.** (2006). "Seed dormancy and the control of germination." The New Phytologist **171**(03): 501-523.
- Ghersa, C. M. León, J.C.** (1999). "Successional changes in agroecosystems of the Rolling Pampas.", Ecosystems of Disturbed Ground. L. R. Walker. Amserdam, Elsevier Science B.V.: 487-502.
- Grismado, C. J.** (2007). "Comunidades de Arañas de la Reserva Natural Otamendi, Provincia de Buenos Aires. Riqueza específica y diversidad.", Universidad CAECE.
- Goggin, D.E.; Stedman, K.J.; Neil Emery, R.J.; Farrow, S.C.; Benech-Arnold, R.L.; Powles, S.B.** (2009) "ABA inhibits germination but not dormancy release in mature imbibed seeds of *Lolium rigidum* Gaud" Journal of Experimental Botany **60** (12) 3387-3396.
- Harper, J. L.** (1957). "The ecological significance of dormancy and its importance in weed control." Proceedings of the international congress crop protection (Hamburg) **4**: 415-420.
- Harper, J. L.** (1977). "Population Biology of Plants." Academic Press. London.
- Hartmann, H.; Kester, D.** (1977). "Propagación de plantas. Principios y Prácticas." Continental. México: 810.
- Harty, E.L.** (1975) "Germination requirements and dormancy effects in seed of *Utochloa mosambicensis*." Tropical Grasslands. **6** (1) 17-24.
- Hauser, E.J.P.** (1963). "The Dipsacaceae and Valerianaceae of Ohio." Ohjio Journal of Science **63**(1): 26-30.
- Helliwell, D.R.; Buckley, G.P.; Fordham, S.J.; Paul, T.A.** (1996). "Vegetation succession on a relocated ancient woodland soil." Forestry **69**(1): 57-74.

- Hilhorst, H.W. Karssen, C.M.** (1992). "Seed dormancy and germination; the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants." Plant Growth Regulation **11**, 225-238.
- Hilhorst, H.W.M.** (1995). "A critical update on seed dormancy. Primary dormancy." Seed Science Research **5**, 61-73.
- Hilhorst, H.W.** (2007). "Definitions and hypotheses of seed dormancy." In Seed development, dormancy and germination. K. Bradford and H. Nonogaki, eds. Oxford, UK. Blackwell Publishing. 50-67. Annual Plant Reviews, **27**.
- Huarte, H. R. Benech-Arnold, R.L.** (2010). "Hormonal nature of seed responses to fluctuating temperatures in *Cynara Cardunculus L.*" Seed Science Research **20**: 39-45.
- Hubbell, S.P.; Werner, P.A.** (1979). "On measuring the intrinsic rate of increase of populations with heterogeneous life histories." The American Naturalist. **113** (2): 277-293.
- Iglesias-Fernández, R. R.-G., M. del C.; Matilla, A. J.** (2011). "Progress in research on dry after-ripening." Seed Science Research **21**(02): 69-80.
- La Greca, L. C.** (2010). "Factores exógenos implicados en la terminación del estado de dormición de semillas de *Dipsacus fullonum L.*" Trabajo Final - Ingeniería en Producción Agropecuaria Trabajo Final de Graduación, Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias.
- Le Page-Degivry, M; Barthe, P.; Garello, G.** (1990). "Involvement of endogenous acid in onset and release of *Helianthus annuus* embryo dormancy." Plant Physiology. **84**: 1164-1168.
- Leo, J.; Ljt-fakulteten., Självständigt; Salomon, Handledare Björn** (2013). "The Effect of Cold Stratification on Germination in 28 Cultural Relict Plant Species" Swedish University of Agricultural Sciences: 53.
- Leymarie, J.; Robayo-Romero, M.E.; Gendreau, E.; Benech-Arnold, R.L.; Corbbineau, F.** (2004). "Involvement of ABA in induction of secondary dormancy in barley (*Hordeum vulgare L.*) seeds." Plant Cell Physiology **49**, 1830-1838.
- Mérola, R.; Días, S.** (2012) "Métodos, técnicas y tratamientos para inhibir dormancia en semillas de plantas forrajeras." Trabajo final curso de post-grado: Producción de semillas de plantas forrajeras. Universidad de la empresa - Facultad de Ciencias Agrarias.
- Msaakpa, T. S.; Obasi, M. O.; Kortese, P. A.** (2013) "Dormancy breaking and germination of castor (*Ricinus communis*) seed." Journal of Agricultural and Biological Science. **8** (5) 391-398.
- Muhammad, S.; Amusa, N. A.** (2003) "Effects of sulphuric acid and hot water treatments on seed germination of tamarind (*Tamarindus indica L.*)" African Journal of Biotechnology **2** (9) 276-279.
- Murdoch, A. J.** (1998).
- Nikolaeva, M. G.** (1977). "Factors controlling the seeds dormancy pattern." Khan A. A. (Eds.) 51-74. "The Physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination." North Holland Publishing, Amsterdam, The Netherlands.
- Nikolaeva, M. G.; Rasumova, M. V.; Gladkova, V. N.** (1985). "Reference book on dormant seed germination." Danilova, M. F. (Ed.) Leningrad, Nauka Publishers.

- Ogawa, K. Iwabuchi, M.** (2001). "A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide." Plant and cell physiology **42**(3): 286-291.
- Parodi, L. R. Dimitri., M.J.** (1972). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Acme S.A:C.I.
- Patiño, F.; de la Garza, P.; Vilagomez, Y.; Talavera, I.; Camacho, F.** (1983). "Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales." Boletín Divulgativo N° 63. México D.F., Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Subsecretaría Forestal.: 181.
- Rector, B. G. Harizanova, V.; Sforza, R.; Widmer, T.; Wiedenmann, R. N.** (2006). "Prospects for biological control of teasels, *Dipsacus* spp., a new target in the United States.", University of Nebraska - Lincoln: 1-14.
- Rouhi, H. R. Rahmati, H.; Saman, M.; Shahbodaghloo, A. R.; Karimi, F. A.; Moosavi, S. A.** (2012). "The effects of different treatments on dormancy-breaking of Galbanum seeds" (*Ferula gummosa* Boiss)." International Journal of AgriScience **2**(7): 598-604.
- Ryder, M.** (1996). "Fascinating Fullonum." Circaea: the journal of the Association for Environmental Archaeology **11**(1): 23-31.
- Schmidt, L.** (2000). "Dormancy and Pretreatment.", Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed, Danida Forest Seed Centre: 38.
- Shanmugvalli, M.; Renganayaki, P. R.; Menaka, C.** (2007). "Seed dormancy and germination improvement treatments in fodder sorghum." Int. Crops Res. Inst. Semi-Arid Tropics. **3** - 1-3.
- Sierra Villagrana, A.** (2005) "Viabilidad de semillas de *Picea mexicana* y su relación con indicadores reproductivos." Tesis Profesional - Ingeniería Forestal, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División Agronomía.
- Snow, R.** (1953). "Phyllotaxis of flowering teasels.", Magdalen College, University of Oxford: 99.
- Solecki, M.K.** (1989). "The viability of cut-leaved teasel (*Dipsacus lacinatus* L.) seed harvested from flowering stems: management implications." Natural Areas Journal. **9**: 106-106.
- Spitters, C. J. T.** (1989) "Weeds: Population dynamics, germination and competition. In Simulation and Systems Management in Crop Protection." Ed. R Rabbinge, S A Ward and H H van Laar. Simulation Monographs, Pudoc, Wageningen. 32, 182–216.
- Stolp, K.M.; Cochran, P.A.** (2006). "Range expansion by cut-leaved teasel (*Dipsacus lacinatus*) in Wisconsin and Minnesota, with a consideration of germination success." The Michigan Botanist. **45**: 201-206.
- Taiz, L. Zeiger, E.** (2010). Topic 23.18, [http://5e.plantphys.net/chapter.php?ch=23\[08-04-2014\]](http://5e.plantphys.net/chapter.php?ch=23[08-04-2014])
- Taylor, K.** (2009). "Biological Flora of The British Islands: *Urtica dioica* L." Journal of Ecology **97**: 1436-1458.
- Tophman, P. N.** (1968). "The Fuller's Teasel." Proc. Bot. Soc. Br. Isl. **7**(3): 5.
- Valle Gutiérrez, C. J. García-Baquero Monero, G.** (1996). "Sobre la vegetación del curso medio del Río Tormes y sus afluentes. (Salamanca, España)." Stud. Bot. **15**: 25-45.

- Waidyanatha, U. P.; Ariyaratne, W. A.** (1976) "Breaking dormancy in seeds of cover legumes." Jl. Rubb. Res. Inst. Sri. Lanka. **53**, 8-16.
- Wanyan, X.** (2010). "Abscisic Acid and Gibberellin control seed germination through negative feedback regulation by mother of FT and TFL1." A Thesis Submitted for the degree of Doctor of Philosophy., National University of Singapore.
- Werner, P. A.** (1972). "Effect of the invasion of *Dipsacus sylvestris* on plant communities in early old-field succession". Ph.D, Michigan State University.
- Werner, P. A.** (1975a). "Predictions of fate from rosette size in teasel (*Dipsacus fullonum* L.)." Oecologia **20**: 197-201.
- Werner P.A.** (1975b). "A seed trap for determining patterns of seed deposition in terrestrial plants". Canadian Journal Botany **59** 810-813.
- Werner, P. A.** (1975c). "The Biology of Canadian Weeds. *Dipsacus sylvestris* Huds." Canadian Journal of Plant Science. **55**(271): 783-794.
- Werner P.A.; Caswell, H.** (1977). "Population Growth rates and age versus Stage-distribution models for teasel (*Dipsacus sylvestris* Huds.)". Ecology. **57**(5): 1103-1111.
- Yoshioka, T.; Endo, T.; Satoh, S.** (1998). "Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by Fluridone, an inhibitor of Abscisic Acid Biosynthesis," Plant Cell Physiologist. **39** (3) 307-312.