



UNR Universidad
Nacional de Rosario

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROGRAMA DE
GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE SOJA.**

Lic. Nidia H. Montechiarini

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Dr. Carlos O. Gosparini

CO- DIRECTOR: Ing. Agr. Eligio N. Morandi

AÑO: 2018

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROGRAMA DE GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE SOJA.

Nidia H. Montechiarini

Licenciada en Biotecnología - Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), bajo la dirección del Dr. Carlos O. Gosparini.

Nidia H. Montechiarini
Doctorando

Carlos O. Gosparini
Director

Eligio N. Morandi
Co- Director

Defendida el 12 de Diciembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

A Eligio, que confió en mí, ofreciéndome la oportunidad de hacer realidad este título que hoy defiendo y, por permitirme ser parte de la Cátedra de Fisiología Vegetal.

A Luciana, que me inició e instruyó en biología molecular. Por involucrarte, acompañarme y guiarme. Por tu paciencia, predisposición, dedicación y generosidad. Por tu tiempo en la lectura crítica y detallada de este trabajo.

A Juan, por tu tiempo y dedicación en los análisis bioinformáticos.

A mis amigos, propios y heredados, por ser el cable a tierra en los malos momentos y brindarme el oxígeno necesario para mantener la energía en el trabajo. A Berta, por ser además, mi “teacher” incondicional y transmitirme siempre tu entusiasmo, responsabilidad y profesionalismo.

A mis compañeros de Cátedra, los que ya no forman parte, los que aún me acompañan desde mi ingreso y los que se incorporaron en el camino; y a los que, sin ser parte de ella, comparten mis días de trabajo; por acercarme al reino vegetal, brindándome las herramientas para conocerlo y aprender a amarlo. Por estar a mi lado en este crecimiento conjunto y constante que significa la docencia, allanando caminos, ayudándome a transitarlos, y por sobre todas las cosas, por los encuentros, mate o asado de por medio, que aportan ese condimento especial a mis días; porque se sigan repitiendo.

A los ayudantes alumnos que transitaron distintas etapas de esta tesis, por la colaboración en los experimentos, por los momentos compartidos. A Regi y Ara, por bancarme todo este tiempo, por la calidad y calidez humana que me brindaron.

Al “grupo de la fisiología” que me acompañó durante toda la tesis, dando el toque de alegría y estímulo necesario para hacer el trabajo más fácil. A Jorgito, “Tijereta o Jorgelina”, como me gustaba llamarlo, a quien aún extraño en cada inicio de mis mañanas.

A los miembros del jurado, por su tiempo, dedicación y el valioso aporte para mejorar la presente tesis.

A mi familia, que sin dudas fue el gran sostén para que hoy esté redactando esta tesis. Por haberme dado la libertad de elegir este camino y la independencia para transitarlo.

A Carlos, mi director y compañero de vida y para quien las palabras de agradecimiento sin dudas no me alcanzan. Por tu pasión contagiosa para todo, tu compromiso constante, por confiar en mí y enseñarme a hacerlo, por tu estímulo permanente y apostar por mí para conformar este gran equipo.

DEDICATORIA

A Tito 

ÍNDICE

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	12
<i>Desarrollo seminal.</i>	13
<i>Germinación de semillas maduras.</i>	15
<i>Dormición de semillas maduras.</i>	18
<i>Dormición de semillas durante el desarrollo.</i>	22
<i>Inducción de la germinación de semillas inmaduras de soja.</i>	24
<i>Activación metabólica durante la germinación.</i>	26
<i>Biomecánica de la germinación.</i>	28
a- <i>Debilitamiento de las envolturas seminales.</i>	28
b- <i>Potencial de crecimiento del embrión.</i>	28
<i>Debilitamiento de pared y expansión celular.</i>	30
<i>Proteínas Expansinas.</i>	32
<i>Proteínas Expansinas de soja.</i>	34
OBJETIVOS	36
Objetivo General.	36
Objetivos específicos.	36
Hipótesis y Predicciones.	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
<i>Modelo Experimental.</i>	37
<i>Condiciones de cultivo y selección del material vegetal.</i>	38
<i>Condiciones de incubación de ejes embrionales.</i>	39
<i>Ensayos de germinación.</i>	39
<i>Determinaciones de peso fresco.</i>	40
<i>Visualización del alargamiento celular.</i>	40
<i>Estudios por Rayos X del ingreso de agua al eje embrional durante la incubación.</i>	40
<i>Observaciones histológicas del alargamiento celular.</i>	41
<i>Estudios histológicos del alargamiento celular por microscopía confocal y electrónica.</i>	41
<i>Extracción y análisis de ABA.</i>	42
-Extracción y preparación de muestras.	42
-Extracción de ABA.	42
-Cuantificación de ABA.	42
<i>Diseño de cebadores para aislamiento e identificación de genes Expansina implicados en la germinación de soja.</i>	43
<i>Extracción de ADN genómico.</i>	44
<i>Extracción de ARN total.</i>	44
<i>Determinación de concentración, pureza e integridad de ADN/ARN.</i>	45
<i>Obtención del ADNc a partir de ARN total.</i>	45
<i>Identificación, amplificación y análisis de secuencias a partir de ADN genómico.</i>	45
<i>Identificación, amplificación y análisis de secuencias a partir de ADNc.</i>	46
<i>Análisis de expresión de EXPA1-like por reacción de RT-PCR.</i>	46
<i>Análisis de expresión de EXPA1-like por reacción de RT-qPCR.</i>	47

RESULTADOS	49
<i>Dinámica de germinación de ejes embrionales y semillas de soja maduras y secas.</i>	50
<i>Control de la expansión celular.</i>	52
<i>Restricción osmótica: Incubación de ejes embrionales de soja en soluciones de diferente potencial agua (Ψ_a).</i>	52
<i>Restricción hormonal: Incubación de ejes embrionales de soja en soluciones de diferente concentración de Ácido Abscísico (ABA).</i>	56
<i>Temporalidad de la acción del ABA: Incubación de ejes embrionales aislados sometidos a transferencias recíprocas Agua - ABA.</i>	58
<i>Identificación de la zona de elongación durante la germinación.</i>	64
<i>Análisis del alargamiento celular.</i>	65
a- <i>Observaciones in vitro.</i>	65
<i>Microscopía óptica.</i>	65
b- <i>Observaciones in vivo.</i>	66
<i>Microscopía confocal.</i>	66
<i>Microscopía electrónica de barrido ambiental.</i>	69
<i>Expansión celular durante la germinación de semillas de soja: Aspectos moleculares.</i>	69
<i>Análisis Bioinformático de secuencias Expansinas para el diseño de cebadores para PCR.</i>	70
<i>Búsqueda de putativas Expansinas a partir de ADN genómico.</i>	72
<i>Búsqueda de putativas Expansinas a partir de ADN copia (ADNc).</i>	73
<i>Análisis de secuencia de ADNc para EXPA1-like.</i>	74
<i>Análisis de expresión de EXPA1-like por Transcripción Reversa seguida de Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR).</i>	77
<i>Naturaleza del proceso germinativo.</i>	79
<i>Análisis de expresión de EXPA1-like por RT-qPCR en ejes embrionales de semillas de soja maduras.</i>	82
<i>Incubación de ejes embrionales maduros y secos en agua destilada.</i>	82
<i>Incubación de ejes embrionales maduros y secos en ABA.</i>	83
<i>Incubación de ejes embrionales maduros y secos en agua destilada y transferencia e incubación en ABA.</i>	84
<i>Incubación de ejes embrionales en madurez fisiológica en agua destilada y ABA.</i>	85
<i>Incubación de ejes embrionales maduros y secos en PEG de $\Psi_a = -1$ MPa y buffer pH8.</i>	86
<i>Dinámica de germinación de ejes embrionales y semillas de soja en desarrollo.</i>	88
<i>Concentraciones de Ácido Abscísico en ejes embrionales de semillas de soja en desarrollo.</i>	90
<i>Análisis de expresión de EXPA1-like por RT-qPCR en ejes embrionales de semillas de soja durante el desarrollo.</i>	92
<i>Análisis de expresión de EXPA1-like por RT-qPCR en ejes embrionales de semillas de soja inmaduras incubados en agua destilada.</i>	93
DISCUSIÓN	95
<i>Debilitamiento de pared celular y expansión.</i>	102
<i>Análisis de EXPA1-like en ejes embrionales de soja maduros y secos.</i>	104
<i>Cuantificación de EXPA1-like en ejes embrionales de soja maduros.</i>	106
<i>Germinación de ejes embrionales de soja durante el desarrollo.</i>	108
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	116

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS

ABA	Ácido abscísico.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia.
BLASTn	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico en base de datos de nucleótidos.
BrEt	Bromuro de etidio.
DDA	Días después de antesis.
EST	Etiquetas de secuencia expresadas. Secuencias de entre 150 y 300 nt que provienen de transcritos poliadenilados expresados (del inglés, Expressed Sequence Tags).
E value	Valor esperado.
MF	Madurez fisiológica.
PS	Peso seco.
PEG	Polietilenglicol 8000.
t_{50}	Tiempo para alcanzar el 50 %G (h).
[ABA]	Concentración de ABA ($\mu\text{g.g PS}^{-1}$).
[ABA] _e	Concentración de ABA del eje embrional ($\mu\text{g.g PS}^{-1}$).
%G	Porcentaje de germinación.
Ψ_a	Potencial agua (MPa).
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction).
RT-PCR	Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa de la Transcripción Reversa cuantitativa (del inglés, Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction).
TAE	Tris clorhidrico-ácido acético-EDTA.
ZE	Zona de elongación del eje embrional.

RESUMEN

La germinación de las semillas es un proceso expansivo, definido por el ingreso de agua a los ejes embrionales y es visualizado como la protrusión radicular a través de las envolturas seminales. Los mecanismos fisiológicos y moleculares que controlan la germinación de las semillas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), y especialmente el rol del Ácido Abscísico (ABA) sobre dicho proceso, constituyen el núcleo principal del presente trabajo. Los ejes inmaduros, entre 25 y 40 días después de antesis (DDA), poseen elevadas concentraciones de ABA ([ABA]_e), las cuales descienden a valores no inhibitorios hacia la madurez. Presentan en consecuencia, restricciones para germinar, con tasas de germinación *in vitro* crecientes con la edad. Por otra parte, los ejes embrionales maduros (45 DDA, madurez fisiológica y >60 DDA, maduros y secos) no están intrínsecamente inhibidos por la [ABA]_e para germinar, aunque la germinación puede ser bloqueada bajo incubación en presencia de ABA exógeno. En base a estos conocimientos, ejes embrionales de semillas de soja, cosechadas entre los 25 y >60 DDA, constituyeron un modelo experimental adecuado para establecer relaciones causa-efecto entre el ABA y el/los posible/s responsable/s metabólico/s que participa/n de la germinación y es/son controlado/s por éste. Al mismo tiempo, permitieron centrar el foco de estudio en el órgano primario implicado en la germinación, sin tener en cuenta los demás órganos seminales que no cumplen roles decisivos en este proceso. La [ABA]_e se cuantificó mediante radioinmunoanálisis, utilizando el anticuerpo monoclonal DBPA1. Para los análisis moleculares se tuvieron en cuenta dos regiones del eje embrional, una de ellas consideró a ambos extremos (plúmula + radícula) y la otra, definida como “Zona de Elongación”, ZE, comprendió la porción del hipocótilo, cuyas células experimentan estrictamente la expansión, constituyendo por lo tanto, la zona principal de estudio. Se evaluó la germinación de ejes embrionales en agua destilada, y en diferentes medios de incubación. La naturaleza expansiva de la germinación fue evaluada a través del control por restricción osmótica durante la imbibición en soluciones de Polietilenglicol 8000 (PEG). La incubación en buffer pH8 tuvo por objetivo inhibir el “crecimiento ácido” descrito como evento inicial responsable del alargamiento celular durante la germinación. El control por ABA sobre las paredes celulares, impidiendo que éstas se relajen, evitando la expansión y el alargamiento del eje embrional, fue evaluado a partir de incubaciones en presencia de la hormona. La estrategia de búsqueda se orientó a

identificar secuencias Expansinas, cuya actividad óptima a pH~4 es indicada sobre el crecimiento ácido de paredes celulares vegetales, resultando por lo tanto responsables primarias de la remodelación de las paredes celulares en la ZE que da lugar al proceso expansivo durante la germinación. Se evaluó la presencia de Expansinas a nivel de ADN genómico. Posteriormente, se amplificó y secuenció un fragmento (EXPA1-like) a partir de ARN mensajero (ARNm) de la ZE de ejes embrionales germinados en agua destilada, el cual presentó una alta homología con la Expansina 1 de soja. Los análisis de expresión se realizaron por la técnica de Transcripción Reversa seguida de Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa, en un único paso, semicuantitativa (RT-PCR) y en dos pasos, cuantitativa y en Tiempo Real (RT-qPCR). Los resultados mostraron la presencia de EXPA1-like mayoritariamente en la ZE de los ejes embrionales, e indicaron tanto que hubo represión por ABA y pH8 como inducción en agua destilada y PEG. Adicionalmente, la presencia del transcripto aún en ejes sin incubación determinó que EXPA1-like forma parte de las biomoléculas almacenadas en el eje embrional de la semilla de soja durante su formación. Estudios complementarios mostraron que, en presencia de un inhibidor transcripcional (α -Amanitina), los ejes embrionales germinaron, aunque a menor tasa y porcentaje que en agua destilada; en tanto no germinaron cuando la traducción fue inhibida en Cicloheximida, indicando que la germinación es posible a partir de los ARNm acumulados durante el desarrollo. Por otra parte, se registró un incremento de expresión progresiva de EXPA1-like en la ZE de ejes embrionales de 25 a >60 DDA, el cual se relacionó con la [ABA]_e decreciente a través del desarrollo. Similarmente, tanto el incremento de EXPA1-like como la caída de [ABA]_e ocurrieron durante la incubación en condiciones de germinación para cada edad. A partir de estos resultados se postula que EXPA1-like participaría de los eventos moleculares decisivos durante la germinación en soja, permitiendo el relajamiento de paredes celulares necesario para que la misma ocurra. Por su parte, la [ABA]_e operaría reprimiendo tanto la síntesis del transcripto EXPA1-like como los eventos moleculares aguas abajo del mismo.

ABSTRACT

Seed germination is an expansive process; it is defined by the embryonic axes water uptake and visualized by the radicle protrusion through seed coats. Physiological and molecular mechanisms that control soybean seed germination and, specially, the role of Abscisic Acid, ABA, constitute the main goal of the present work. Immature axes from 25 to 40 days after anthesis (DAA) have high ABA levels ([ABA]_a) which decrease until non-inhibitory values at maturity. They consequently possess germination restrictions and their *in vitro* germination rates increase with age. On the other hand, mature embryonic axes (45 DAA, physiological maturity and >60 DAA, dry mature) are not intrinsically inhibited by [ABA]_a to germinate, although germination can be blocked under exogenous ABA incubation. Then, embryonic axes of soybean seeds, collected from 25 to >60 DAA, were an appropriate experimental model to establish cause-effect relationships between ABA and those possible metabolic effectors that participate on germination and are controlled by ABA. At the same time, these allow to focus the study on this principal organ, without considering the rest of seed organs that do not have a key role on germination. [ABA]_a quantifications were performed by radioimmunoassay based on the use of the monoclonal antibody DBPA1. Molecular analyses were made in two regions from the embryonic axes, the extremes (plumule + radicle) and the elongation zone, EZ, into the hypocotyl, whose cells strictly experience the expansive process and are, consequently, the main zone of study. We evaluated embryonic axes germination on distilled water and other solutions. The expansive nature of germination was evaluated by osmotically restraining imbibition in Polyethylene glycol 8000 solutions (PEG). The aim of pH8 incubation was to inhibit the “acid growth” which is referred as the initial event responsible for the enlargement during germination. The ABA control on cell wall relaxing by avoiding the expansion and thus the embryonic axes enlargement was evaluated in ABA incubations. The molecular strategy was focused on identifying Expansin sequences, whose optimum activity at pH~4 is indicated on plant cell wall acid growth, thus being in consequence, primary responsible for the cell wall remodeling on EZ that defines the expansive process during germination. We evaluated Expansins on genomic DNA. After that, a fragment (EXPA1-like) was amplified and sequenced from the messenger RNA (mRNA) of germinated embryonic axes in distilled water, which presented a high homology with the EXP1 of

soybean. Expression analyzes were performed by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in one step, semiquantitative (RT-PCR) and in two steps, quantitative and in Real Time (RT-qPCR). The results showed that EXPA1-like was mostly present in EZ, showing both a repression by ABA or pH8, and induction in distilled water or PEG. Additionally, the presence of this transcript in EZ, still, without any incubation, determined that EXPA1-like is part of the storage biomolecules in soybean embryonic axes during its formation. Complementary studies showed that, in the presence of a transcriptional inhibitor (α - Amanitin), the embryonic axes germinated, although at lower rates and percentages than in distilled water; meanwhile they did not germinate when translation was inhibited in Cycloheximide, thus indicating that germination is possible from mRNA accumulated through seed development. On the other hand, an EXPA1-like expression progressively increasing in EZ from 25 - >60 DAA embryonic axes was measured, which was related to the [ABA]a decreasing through the development. Similarly, both the EXPA1-like increased and [ABA]a decreased during incubations in germination conditions for each age. According to these results, we postulate that EXPA1-like would participate as the decisive molecular events during soybean germination, allowing relaxation of cell wall necessary for it to happen. The [ABA]a would operate repressing both EXPA1-like transcription and the molecular events downstream of it.

INTRODUCCIÓN

Las semillas son la unidad de reproducción y dispersión de las espermatófitas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen. Esta situación ubica a las semillas en una posición crítica, dado que ellas almacenan toda la información genética necesaria para dar origen a un nuevo individuo, asegurando de esta manera que la próxima generación se esparza, establezca y eventualmente reproduzca (Nambara y Nonogaki, 2012). En este sentido, las plantas han desarrollado diversas estrategias para garantizar la exitosa germinación de estos sistemas de dispersión genética. Entre ellas, la apropiada distribución espacial y temporal de la germinación, la cual es crítica para la supervivencia y proliferación de las plantas con semillas y ha permitido el establecimiento de las mismas sobre la superficie terrestre en casi todas las latitudes, y desde el nivel del mar hasta casi los 5000 msnm. La distribución espacial de la germinación está generalmente controlada a través de la morfología de la semilla y el fruto. En contraste, la distribución temporal de la germinación está modulada principalmente por el estatus fisiológico / bioquímico de las semillas. Así, las variaciones fisiológicas individuales presentes en una población permite a cada semilla germinar en un momento diferente, lo cual constituye una estrategia relevante, ya que evita la competencia entre semillas hermanas o la extinción de todos los individuos debido a una condición desfavorable (Nonogaki, 2014). Consecuentemente, el éxito con el que el nuevo individuo se establece, el lugar, el tiempo y el vigor, están ampliamente determinados por características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la semilla; dependiendo además de la respuesta al ambiente y de las reservas que ésta contiene, las cuales estarán disponibles para sostener a la plántula en las etapas tempranas de crecimiento, antes que la misma se vuelva un organismo independiente y autotrófico (Bewley y Black, 1994). Por otra parte, la transición del hombre de su naturaleza cazadora-recolectora al desarrollo de la agricultura, ha contribuido, desde hace aproximadamente 10000 años, a la domesticación de las principales especies cultivadas sobre las cuales se basa la alimentación humana (Doebley *et al.*, 2006). Esto implicó la eliminación total o parcial de ciertas de estas características ancestrales que controlan la germinación de las semillas, con el objetivo de garantizar un establecimiento rápido y uniforme del cultivo.

En el caso particular de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), es ampliamente aceptado que la misma fue domesticada a partir de su progenitor salvaje *G. soja*. Las sojas cultivada y salvaje difieren en un grupo de características fisiológicas y morfológicas designadas colectivamente “síndrome de domesticación” (Doebley *et al.*, 2006). Entre ellas, la soja salvaje presenta un grado de dureza de semilla mayor respecto a la soja cultivada, lo que determina, entre otros factores, una restricción de la absorción rápida de agua, afectando severamente la germinación (Jang *et al.*, 2015). Esta barrera fue total o parcialmente perdida por el proceso de domesticación en las leguminosas en general y determinó que los cultivares de soja actuales no presenten restricciones para su germinación (Paulsen *et al.*, 2013). Por otra parte, el brotado de las semillas maduras y secas a partir del aporte eventual de agua de lluvia previo a la cosecha es evitado o reducido severamente por la muy baja dehiscencia natural que presentan las vainas en las cuales están contenidas estas semillas.

Desarrollo seminal.

En angiospermas, el desarrollo seminal se inicia con la doble fertilización. La ovocélula haploide y la célula central diploide del gametofito femenino dentro del óvulo se fusionan, cada una, con una célula espermática del tubo polínico para formar el cigoto ($2n$) y las células del endosperma ($3n$), respectivamente. El cigoto sufre una serie de eventos de diferenciación, resultando en la formación de un embrión maduro y un suspensor, una estructura efímera que soporta física y fisiológicamente al embrión durante la embriogénesis temprana. El endosperma es una estructura transitoria o persistente dentro de la semilla, siendo retenido en diferente grado en semillas endospermadas, o completamente absorbido por el embrión durante el desarrollo en semillas que carecen del mismo. El otro componente principal de las semillas es la testa o tegumento, que, al derivar de los integumentos del óvulo, es por lo tanto de origen materno (Bewley *et al.*, 2013).

En soja, la polinización ocurre aproximadamente el día antes que se produzca la apertura total de la flor o antesis, en tanto la fecundación ocurre aproximadamente 10 horas después de la polinización, por lo que se considera que la fertilización coincide temporalmente con el día de la antesis (Carlson y Lersten, 1987). Es por ello que la edad de las semillas, así como los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo del embrión se ubican cronológicamente en función de los días después de la antesis (DDA).

El desarrollo de la semilla de soja comprende tres etapas bien definidas y estrictamente reguladas.

- 1- Histodiferenciación, se inicia con la fertilización de la ovocélula por parte del núcleo proveniente del tubo polínico y se extiende hasta los 20 - 21 DDA. Como su nombre lo indica, corresponde a una etapa donde se diferencian todos los órganos del embrión que darán lugar a la semilla madura.
- 2- Acumulación de reservas, corresponde al período caracterizado por una alta actividad anabólica donde se sintetizan y acumulan las sustancias de reserva que serán utilizadas inmediatamente después de la germinación y sostendrán el crecimiento del nuevo individuo hasta que el mismo se vuelva totalmente autotrófico. Comprende un período de 25 días, aproximadamente, hasta llegar a la madurez fisiológica (MF), donde la semilla alcanza el máximo peso seco y se interrumpen las conexiones vasculares con la planta madre.
- 3- Deshidratación, es la última etapa del desarrollo y es característica de las semillas ortodoxas, donde los tejidos se deshidratan hasta valores bajos de contenido hídrico, dando lugar a una semilla quiescente. El contenido de humedad de la semilla madura y seca oscila entre 8 y 13% (base peso fresco). La duración de esta etapa varía en función de la demanda atmosférica de humedad.

La semilla de soja madura, generalmente oval en forma, como la mayoría de las leguminosas, carece de endosperma. Consiste de una cubierta seminal que rodea un gran embrión. La cubierta seminal tiene un hilo que varía en forma y color. En un extremo del hilo está la micrópila, un pequeño orificio formado durante el desarrollo seminal por el ingreso del tubo polínico a través del óvulo, y es cubierta por una cutícula a la madurez. El embrión consiste de dos cotiledones carnosos y un eje embrional con dos extremos definidos. El extremo plumular presenta dos hojas primarias bien desarrolladas que encierran un primordio foliar trifoliado y está vinculado al extremo radicular a través del hipocótilo (Fig. 1).

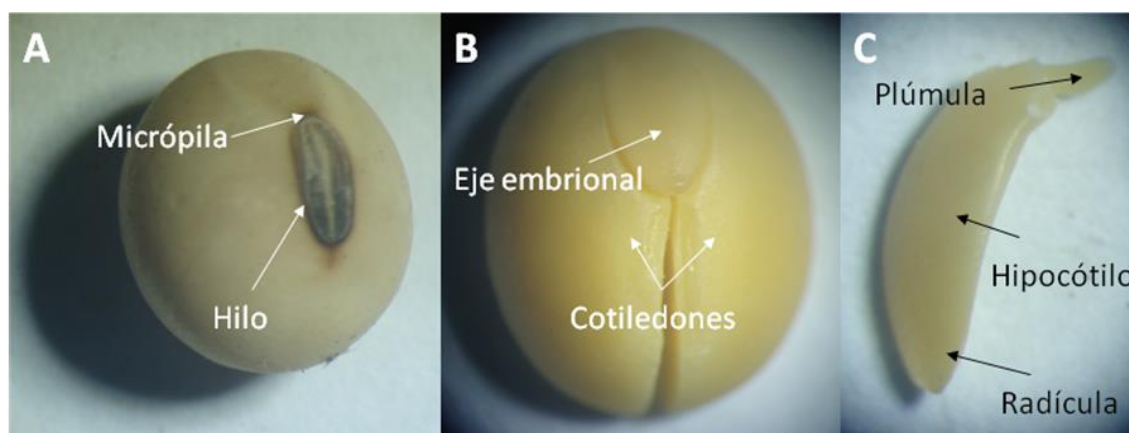


Figura 1. A) Semilla de soja madura y seca. B) Embrión de soja, que corresponde a una semilla a la que se le retiró el tegumento. C) Eje embrional aislado de semilla de soja.

Germinación de semillas maduras.

El concepto fisiológico de germinación comprende al proceso que se inicia con la absorción de agua por parte de la semilla y culmina con la aparición del embrión, o específicamente la radícula, a través de las envolturas seminales (Bewley y Black, 1994; Bewley, 1997). Esta definición se denomina germinación “en sentido estricto” (*sensu stricto*) para diferenciarla del concepto agronómico, el cual determina que la germinación de las semillas culmina cuando la plántula ha emergido sobre la superficie del suelo; o del empleado en análisis de semillas, que considera el desarrollo de las raíces, hipocótilo y cotiledones, para indicar que la germinación se ha completado (Bewley *et al.*, 2013).

Las semillas quiescentes son órganos en reposo, con bajo contenido de humedad (5-15%) y actividad metabólica casi imperceptible. Para germinar, estas semillas necesitan sólo ser hidratadas bajo condiciones que soporten su metabolismo, por ejemplo, temperatura adecuada y presencia de oxígeno (Bewley *et al.*, 2013). La absorción de agua por las semillas es un paso inicial y esencial para la germinación, dado que la reasunción del metabolismo y la iniciación de los eventos celulares que dan lugar a la emergencia de la radícula se realizan en una matriz de alta disponibilidad hídrica. El factor más importante que gobierna el movimiento y la tasa de ingreso de agua desde el medio de imbibición a la semilla está dado por las diferencias de potencial agua (Ψ_a) entre la semilla y el medio (Weitbrecht *et al.*, 2011). En condiciones favorables, la dinámica de absorción hídrica de las semillas puede ser descrita en tres fases (Fig. 2). El muy bajo Ψ_a inicial presente en las semillas secas (que puede alcanzar valores de -300 MPa o aún menores) causa una rápida

afluencia de agua durante la Fase I (Fig. 2). Este proceso es exclusivamente físico, impulsado por el componente mátrico debido fundamentalmente a la presencia de las paredes celulares y polímeros de reserva. Durante la imbibición, la semilla se hincha rápidamente y cambia de tamaño y forma. Hacia finales de la Fase I, la tasa de ingreso de agua se desacelera y la semilla ingresa en la Fase II (Fig. 2), donde su contenido de agua se mantiene constante o aumenta lentamente. El componente osmótico toma en adelante relevancia, entrando en equilibrio con el Ψ_a del medio de imbibición mediante la generación de turgencia en las células embrionales. Durante esta fase el cese importante de ingreso de agua puede deberse a dos motivos fundamentales. Por un lado, la presión de turgencia celular (generada por la absorción de agua) compensa el gradiente osmótico. En este caso, la presión hidráulica estaría contenida por las paredes celulares de los tejidos vivos de la semilla, impidiendo una mayor expansión en tanto las paredes no se relajen. Alternativa o adicionalmente, los tejidos externos que envuelven y protegen al embrión (endosperma y/o tegumentos) pueden operar restringiendo la expansión del mismo. Así, tanto la extensibilidad de la pared celular del embrión como la resistencia a la expansión por parte de los tejidos circundantes pueden estar implicadas en la determinación del contenido de agua alcanzado durante la fase II de absorción hídrica. Finalmente, un nuevo incremento inicial y breve en la absorción de agua durante la Fase III (Fig. 2) está relacionado con la concreción de la germinación, la cual implica estrictamente un aumento expansivo de volumen de las células en el eje embrional y es visualizada como la protrusión de la radícula a través de las envolturas seminales. En adelante, el descenso del potencial osmótico debido a la producción de compuestos osmóticamente activos que resultan de la hidrólisis postgerminativa de las sustancias de reserva almacenadas, determina una absorción de agua mucho mayor a medida que la plántula crece debido a divisiones mitóticas y expansión celular. La tasa de ingreso de agua a la semilla es crítica para el éxito de la germinación. Si el agua ingresa muy lentamente, la activación metabólica temprana de la semilla podría conducir a un deterioro de la misma frente a niveles hídricos insuficientes para germinar. Si el agua ingresa muy rápido, las semillas podrían sufrir un daño por exceso de imbibición (Bewley y Black, 1994).

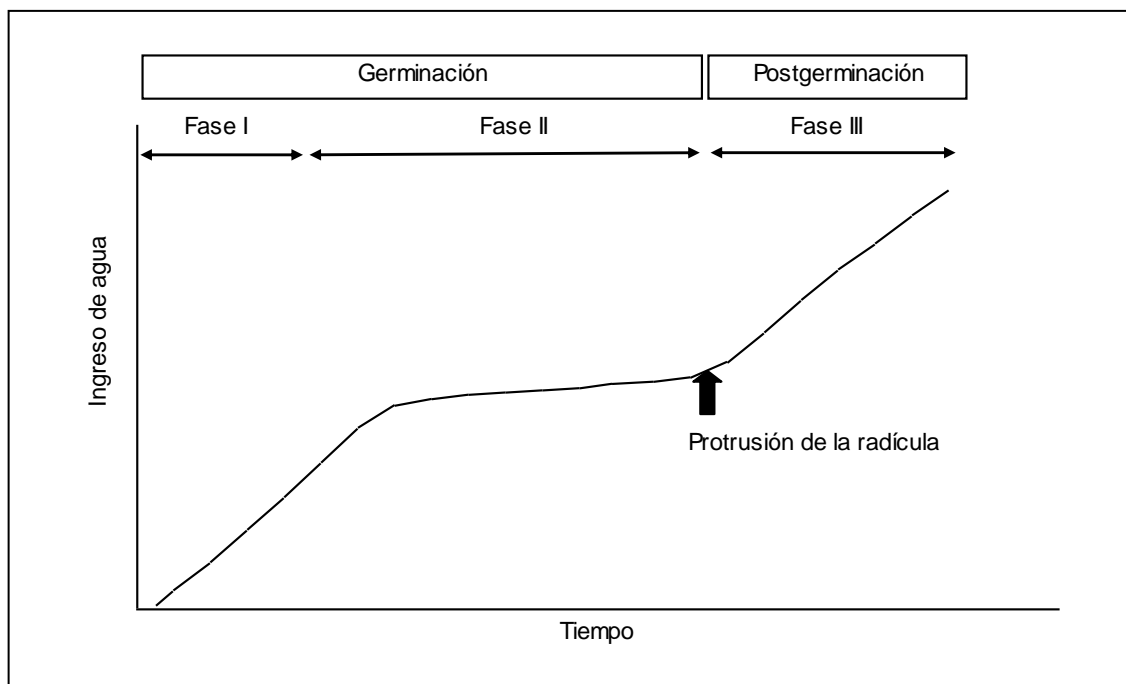


Figura 2. Patrón trifásico de ingreso de agua a una semilla durante la germinación.

La semilla de soja madura, generalmente de forma esférica (esferoide prolato), colocada en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, embeberá agua e iniciará el proceso de germinación epígea. La imbibición de agua cambia la forma normalmente oval de la semilla a reniforme. Una vez que la cubierta seminal y el embrión están completamente embebidos, la germinación procede, visualizándose la emergencia de la radícula a través de la cubierta seminal, normalmente en la región de la micrópila (Kumudini, 2010; Fig. 3).

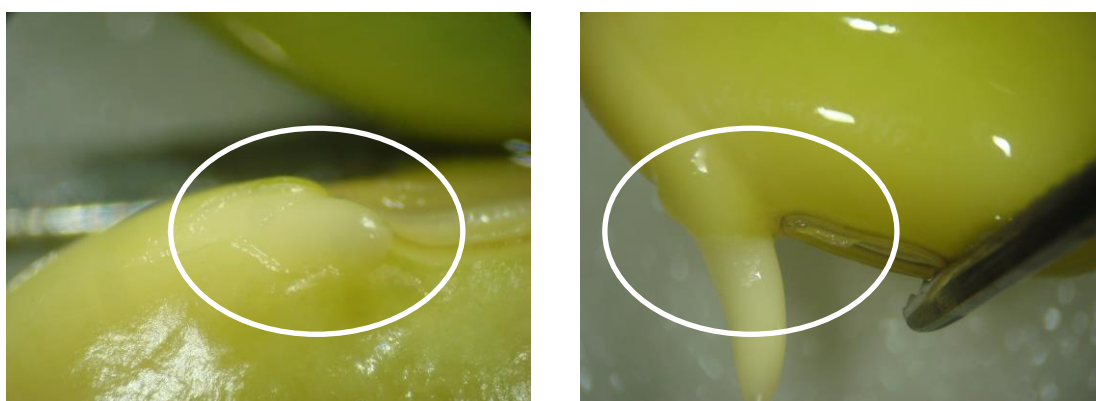


Figura 3. Germinación de semillas de soja. Se visualiza la ocurrencia de la protrusión en la región correspondiente a la micrópila, comprendida dentro del círculo blanco.

Dormición de semillas maduras.

Las plantas han desarrollado mecanismos que regulan la germinación de las semillas de manera de coincidir con la estación del año más propicia para su supervivencia. La dormición está genética y ambientalmente determinada y tiene por objetivo garantizar la germinación de las semillas cuando las condiciones ambientales resultan adecuadas para su posterior desarrollo, maximizando las ventajas competitivas y asegurando el establecimiento de la planta. Así, algunas semillas viables permanecen en fase II de absorción hídrica y fallan en completar su germinación aún bajo condiciones favorables, requiriendo la exposición a determinados estímulos ambientales para superar la dormición. La transición entre dormición y germinación de las semillas representa una etapa crítica en el ciclo de vida de las plantas y es un rasgo ecológico de suma importancia. La dormición es generalmente clasificada en dos tipos principales: dormición embrionaria y dormición por cubiertas. En la dormición embrionaria, la germinación no ocurre aún si el embrión, una vez liberado de los tejidos seminales que lo rodean, es incubado en condiciones propicias (Bewley *et al.*, 2013). En la dormición por cubiertas, el embrión aislado es capaz de germinar, no así la semilla intacta, siendo una o más de las envolturas embrionales el/los tejido/s que impone/n el bloqueo a la germinación. Tanto la dormición embrionaria como por cubiertas pueden existir simultánea o sucesivamente y en diferente grado en algunas especies (Bewley y Black, 2004 citado en Kermode, 2005). La dormición embrionaria implica mecanismos fisiológicos asociados a la presencia de sustancias reguladoras de la germinación. Entre los inhibidores de la germinación, el más conocido y estudiado es la hormona vegetal Ácido Abscísico (ABA; Fig. 4), un sesquiterpenoide (C₁₅) cuya biosíntesis incluye tres etapas principales, las dos primeras ocurren en los plástidos, en tanto la última etapa, que da origen a la molécula activa, se produce en el citosol (Seo y Koshiba, 2002). La vía de señalización del ABA es evolutivamente muy antigua y la presencia de dicha molécula es ubicua en vegetales superiores y aún ha sido demostrada dentro del reino animal (Graeber *et al.*, 2010).

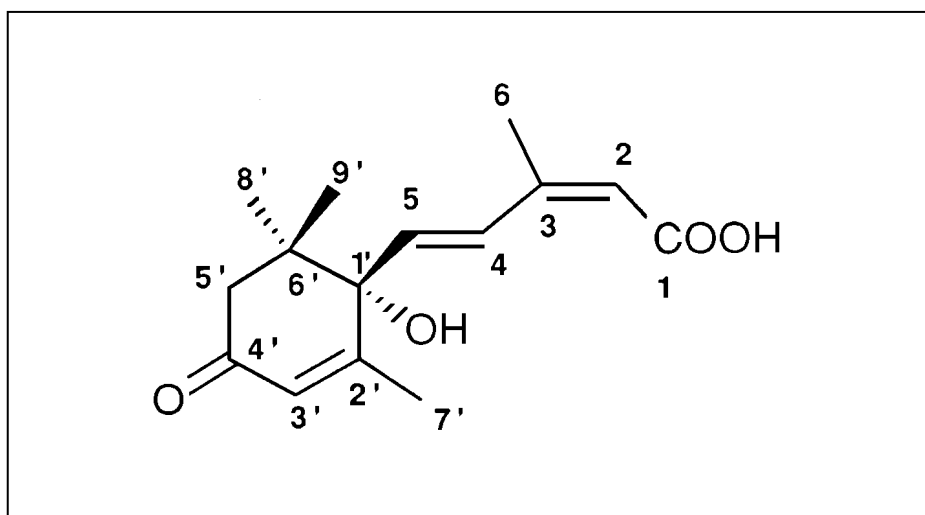


Figura 4. Fórmula estructural de la molécula de S-(+)-ABA.

En plantas superiores, el ABA es sintetizado a partir de la ruptura oxidativa del doble enlace 11–12 de 9-*cis*-epoxi-carotenoides, catalizada por la enzima nueve-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED). La enzima NCED ha sido identificada en varias especies y su acción constituye la etapa limitante de velocidad de la vía (Hu *et al.*, 2010). El ABA funciona a través de una compleja red de vías de señalización donde la respuesta celular es iniciada por la percepción del mismo, gatillando una cascada de señalización aguas abajo para inducir el efecto fisiológico final. La evidencia más reciente que refuerza esta hipótesis se inicia a partir del descubrimiento del receptor para ABA, el cual pertenece a una familia de proteínas solubles conocidas como PYR/PYL/RCAR (Melcher *et al.*, 2009; Raghavendra *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010). La unión del receptor al ABA inhibe la actividad de proteínas fosfatasa específicas del tipo PP2Cs, desencadenando una cascada de fosforilaciones que dará inicio a la transcripción de elementos promotores de respuesta al ABA (Fujii *et al.*, 2009; Melcher *et al.*, 2009; Miyazono *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009; Sheard y Zheng, 2009). Varios de estos factores de transcripción consistentes de proteínas leucina zipper básicas han sido identificados, los cuales se unen específicamente a secuencias cortas de ADN que actúan en *cis* en las regiones promotoras de sus genes blanco para regular sus niveles de expresión en respuesta al ABA (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009). Estas secuencias de ADN son conocidas como secuencias ABRE, por sus siglas en inglés, ABA response element (Jakoby *et al.*, 2002, Yoshida *et al.*, 2010).

El ABA regula muchos procesos durante el ciclo de vida de las plantas, entre ellos, es responsable de promover el cierre estomático y regular la expresión de genes vinculados a la adquisición de tolerancia a la desecación en tejidos vegetativos, jugando un rol importante en la adaptación a estreses abióticos tales como sequía y alta salinidad (Nakashima *et al.*, 2006). Durante la formación de la semilla, es clave en la deposición de las sustancias de reserva, la prevención de la germinación precoz, la adquisición de tolerancia a la desecación y la inducción de dormición (Kermode, 2005). Los niveles de ABA endógeno y el patrón de expresión de genes regulados por ABA cambian drásticamente durante el desarrollo de las semillas en respuesta a indicios tanto del desarrollo como ambientales (Bellin *et al.*, 2009).

Por el contrario, otros reguladores han sido descritos en el proceso de superación de la dormición o inductores de la germinación en vegetales; entre ellos, los de naturaleza hormonal como el Ácido Giberélico (GA) y el Etileno y otros compuestos que operan como mensajeros químicos tales como el Óxido Nítrico (NO) y sustancias como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical oxhidrilo ([•]OH) y radical superóxido (^{•-}O₂), conocidas genéricamente como especies reactivas del oxígeno (ROS). La regulación de la dormición y germinación de semillas por el balance hormonal entre ABA y GA ha sido bien documentada (Finkelstein *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009; Nambara *et al.*, 2010; Nonogaki *et al.*, 2010; Weitbrecht *et al.*, 2011; Graeber *et al.*, 2012; Rajjou *et al.*, 2012; Benech-Arnold y Rodríguez, 2018; Liu y Hou, 2018), en tanto existen menos antecedentes en cuanto al rol de los otros compuestos de señalización y su interacción con el metabolismo y vía de señalización por ABA (Liu *et al.*, 2010; Oracz *et al.*, 2009; Bahin *et al.*, 2011, citados por Ishibashi *et al.*, 2012; Arc *et al.*, 2013; Sarath *et al.*, 2007).

En las semillas de soja madura, la presencia del tegumento constituía la única barrera a la germinación en la especie. Sin embargo, esta naturaleza “dura” fue eliminada durante el proceso de domesticación, por lo que no representa un impedimento a la germinación para los cultivares de soja actuales (Paulsen *et al.*, 2013). Adicionalmente, si bien no existen evidencias de dormición embrionaria en estas semillas, la incubación de las mismas en presencia de determinadas concentraciones de ABA ([ABA]) inhibe la transición de la fase II a la fase III de ganancia de agua, sin afectar la ocurrencia de las fases I y II ni la ruptura de las cubiertas seminales, similarmente a lo informado por Schopfer y Plachy (1984) para semillas de *Brassica napus*. Por otra parte, Puntarulo *et al.* (1988) demostraron la

producción de ROS en el eje embrional durante la germinación de semillas de soja. Posteriormente, Ishibashi *et al.* (2012) encontraron que la producción de Etileno y, en consecuencia, la germinación de semillas de soja, se incrementó bajo tratamiento con H_2O_2 , en tanto disminuyó en presencia de N-acetilcisteína (NAC), un antioxidante que suprimió el contenido de H_2O_2 . Adicionalmente, el tratamiento de las semillas con NAC más Etefón (el cual es convertido a Etileno) revirtió el efecto del NAC sobre la germinación. Estos autores sugirieron que la germinación de las semillas de soja estaría regulada a través de la producción de Etileno en respuesta a las ROS generadas después de la imbibición, indicando que el Etileno regula la longitud de los ejes embrionales incrementando el tamaño y no el número, de las células del extremo de la raíz. Coincidentemente, nosotros identificamos la producción de ROS durante la germinación de ejes embrionales de soja (Fig. 5 A), la cual fue significativamente reducida en presencia de [ABA] inhibitorias para la germinación (Fig. 5 B).

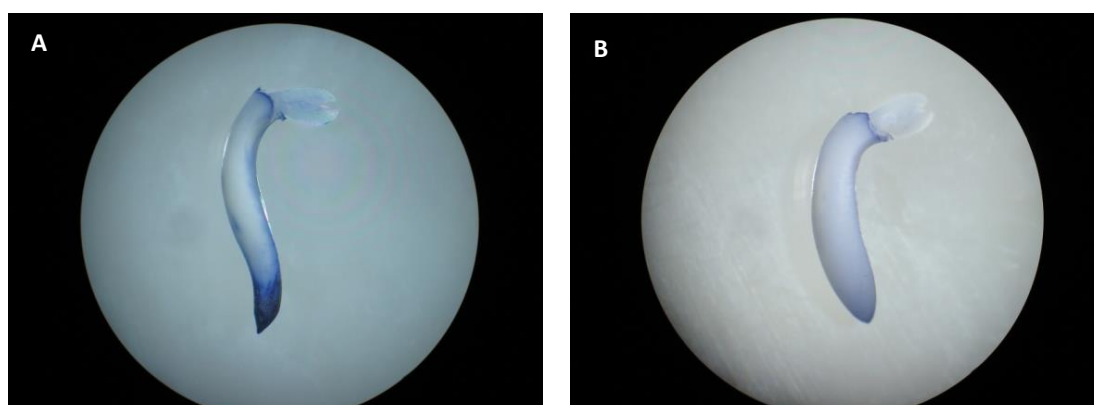


Figura 5. Ejes embrionales de soja incubados durante 18 horas en A) agua destilada y B) solución 50 μ M de ABA, y luego teñidos en solución de Nitro Blue Tetrazolio (NBT), el cual se torna de color azul intenso en presencia de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

Por otra parte, otros trabajos en los que se evalúan diferentes aspectos de la germinación en soja, vinculan el control de dicha germinación con el balance hormonal ABA – GA (Han *et al.*, 2013; Bellieny-Rabelo *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2016).

Dormición de semillas durante el desarrollo.

El proceso de desarrollo seminal, sumamente complejo, procede en un ambiente en el cual las semillas están altamente hidratadas y, aunque la capacidad de las mismas para germinar es a menudo adquirida bastante antes que el desarrollo se complete, las semillas usualmente no germinan sobre la planta madre, sino sufren el proceso de maduración que generalmente incluye desecación previo a la dispersión. A este fenómeno se lo denominó "dormición durante el desarrollo" (Bewley y Downie, 1996). El ABA embrional es responsable de inhibir esta transición desde el crecimiento embrional a la germinación y juega un rol central aún en la inducción y mantenimiento de la dormición de semillas maduras. Así, la biosíntesis de ABA en el embrión y los tejidos seminales que lo rodean estimulan el proceso de maduración al tiempo que suprimen la germinación precoz (Kermode, 2005). Por otra parte, la maduración no es un proceso obligatorio para que la germinación sea posible y, existen amplias evidencias que semillas inmaduras son capaces de germinar cuando son removidas del fruto e incubadas en agua (Bewley y Black, 1994; Bradford y Nonogaki, 2007). Más aún, existen casos en los que embriones en desarrollo germinan directamente en la planta madre (viviparidad). El ejemplo más reconocido de viviparidad natural ocurre en el mangle, *Rhizophora mangle*, árbol que crece en ambientes marítimos, con alta humedad relativa. También se presenta en otras especies con distribución más continental, como en *Sechium edule* (chayote) de origen mesoamericano.

En semillas de varias especies, que no presentan dormición a la madurez, se ha encontrado una correlación negativa entre el contenido de ABA y la germinabilidad durante el desarrollo (Black, 1991). La evidencia disponible del rol decisivo del ABA en la prevención de la germinación durante el desarrollo proviene de alteraciones en el contenido y/o sensibilidad al ABA. Entre ellas se pueden citar los casos de viviparidad espontánea de mangle (Sussex, 1975) y chayote (Vernieri, 1989) mencionados previamente, al igual que los mutantes *abi* de *Arabidopsis* y los *vp1* y *rea* de maíz (Leung y Giraudat, 1998), los cuales presentan baja sensibilidad al ABA y por ende, una marcada reducción en la dormición de las semillas; los mutantes *aba* de *Arabidopsis* (Karssen *et al.*, 1983.), *flacca* (*flc*), *sitiens* (*sit*) (Karssen, 1995) y *notabilis* (*not*) de tomate (Burbidge *et al.*, 1999) y los mutantes vivíparos de maíz *vp2*, *vp5*, *vp7*, *vp8* y *vp9* (Robichaud *et al.*, 1980), deficientes en la síntesis de ABA,

y los mutantes dobles *aba* y *abi3-1* de *Arabidopsis* (Karssen, 1995) con bajo contenido y baja sensibilidad al ABA, cuyas semillas tienden a presentar viviparidad. El establecimiento de la dormición durante el desarrollo seminal coincide frecuentemente con un aumento transitorio en el contenido de ABA. En la mayoría de las especies estudiadas, el contenido de ABA aumenta durante la primera mitad del desarrollo de la semilla y disminuye durante la maduración. Adicionalmente, en semillas de *Arabidopsis* se observaron dos picos de ABA durante el desarrollo, el primero de origen materno y cigótico y el segundo exclusivamente cigótico, los cuales contribuyen a la dormición embrionaria durante el desarrollo y en la semilla madura, respectivamente (Okamoto *et al.*, 2006). Es importante tener presente que, aun existiendo similitudes en cuanto al rol del ABA en la inducción de la dormición de semillas maduras y en el mantenimiento de la dormición de semillas durante el desarrollo, ambas situaciones no son equivalentes (Bewley y Downie, 1996). En particular, el metabolismo de las semillas inmaduras difiere cualitativa y cuantitativamente respecto al de semillas maduras durmientes. Tampoco las semillas inmaduras han pasado por la etapa de deshidratación que caracteriza a la fase final de la maduración. Asimismo, durante el desarrollo seminal de la mayoría de las angiospermas, además de la inhibición de la germinación precoz, también se producen: i) la síntesis de proteínas para la acumulación de sustancias de reserva y de embriogénesis tardía (Black, 1991; Ackerson, 1984; Eisemberg y Mascarenhas, 1985; Bray y Beachy, 1985); ii) la inducción de la tolerancia a la deshidratación (Meurs *et al.*, 1992) y iii) en muchos casos, la adquisición de mecanismos de dormición (Zeevaart y Creelman, 1988). Para todos estos procesos, la participación del ABA ha sido demostrada en alguna medida (Black, 1991; Bradford y Nonogaki, 2007). Luego, durante el desarrollo de la semilla, una misma sustancia (ABA) actuaría inhibiendo o estimulando diferentes procesos fisiológicos. Si bien todos ellos se dan durante la fase de maduración de la semilla, con distinto grado de superposición, los mismos se localizan en distintos tejidos y no responden de manera uniforme al ABA. Por ejemplo, la síntesis de sustancias de reserva es estimulada por ABA y ocurre principalmente en las células de los cotiledones o del endosperma, mientras que la inhibición de la germinación tiene como principal tejido "blanco" a las células del eje embrional. Esta separación espacial y/o temporal puede a su vez ser total o parcial, exhibiendo cada proceso su propia curva dosis-respuesta al ABA. (Bewley y Downie, 1996; Leung y Giraudat, 1998).

Inducción de la germinación de semillas inmaduras de soja.

La germinación de las semillas inmaduras de soja no ocurre si las mismas permanecen unidas a la planta madre. Sin embargo, luego de la finalización de la histodiferenciación (aproximadamente a los 21 DDA) el embrión contiene todos los tejidos vegetativos de la nueva planta y está intrínsecamente en condiciones de germinar. De hecho, si se aíslan embriones a partir de esa edad y se los cultiva *in vitro*, los mismos germinan (Tilton y Russell, 1984; Lippmann y Lippmann, 1993; Roumet y Morin, 1997). Por otra parte, semillas inmaduras extraídas de frutos cosechados anticipadamente e incubadas *in vitro*, en condiciones adecuadas de humedad, temperatura y oxígeno, pueden ser inducidas a germinar a partir de mediados del desarrollo (Miles *et al.*, 1988; Gosparini y Morandi, 1991; Gosparini *et al.*, 1997). Sin embargo, sus tasas de germinación son extremadamente bajas comparadas con la tasa de germinación de semillas maduras, indicando que existen restricciones internas que deben ser removidas antes que las semillas inmaduras puedan germinar normalmente. Además, la tasa de germinación de las semillas inmaduras aumenta con la edad entre los 25 y 45 DDA (Gosparini y Morandi, 1991; Gosparini *et al.*, 1997; Gosparini, 2002), período durante el cual la [ABA] de las semillas *in planta* disminuye (Ackerson, 1984; Morandi *et al.*, 1990). La [ABA] en los distintos órganos de la semilla de soja en desarrollo es baja al comienzo de la embriogénesis, aumentando rápidamente hasta alcanzar el pico máximo entre los 18 y 21 DDA (coincidiendo aproximadamente con la finalización de la histodiferenciación), para luego caer lentamente hasta valores muy bajos a la MF (Fig. 6; Ackerson, 1984; Schussler *et al.*, 1984; Morandi *et al.*, 1990).

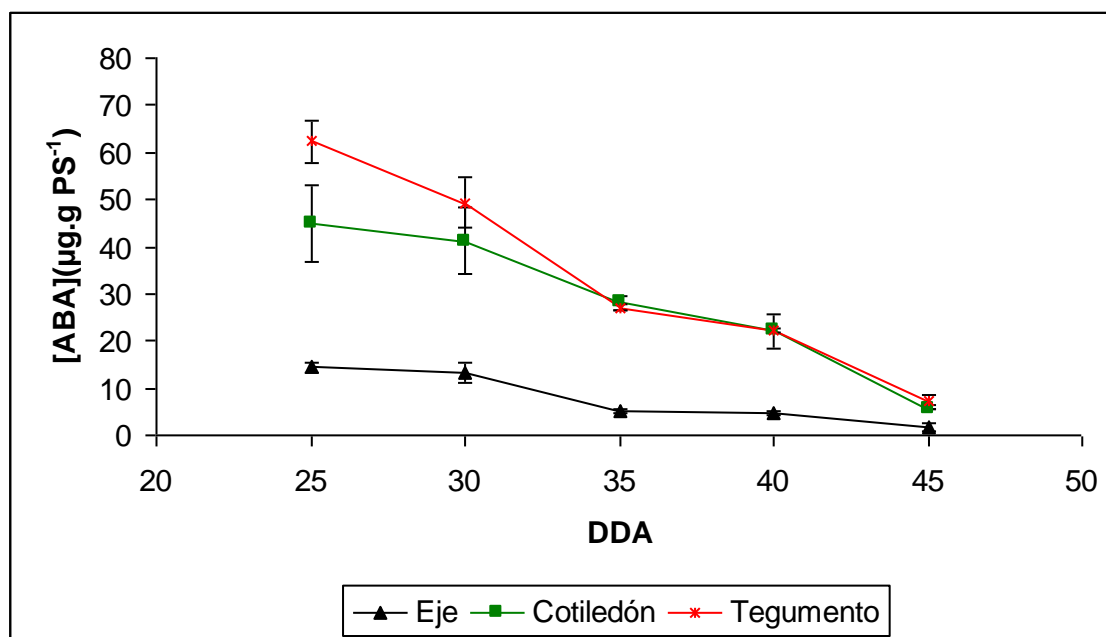


Figura 6. Evolución de la concentración de ABA ($\mu\text{g.g PS}^{-1}$) del Eje embrional, Cotiledones y Tegumento de semillas inmaduras de soja en función de los días después de la antesis (DDA). Tomado de Gosparini *et al.*, 2007.

Adicionalmente, Gosparini *et al.* (2007) demostraron que la sensibilidad de los tejidos al ABA también disminuye a medida que se avanza en el desarrollo. Luego de la MF se inicia la fase de rápida deshidratación que culmina en una semilla madura y seca y su [ABA] es extremadamente baja (Gosparini, 2002). Es luego lógico suponer que el efecto de la edad sobre la germinación de las semillas inmaduras está en realidad controlado por la [ABA] endógena, y que las mismas no germinarán hasta no haber reducido su [ABA] por debajo de un cierto nivel (umbral de inhibición).

Activación metabólica durante la germinación.

Los cambios celulares que ocurren durante la germinación de semillas maduras y secas son complejos, ya que en la imbibición el metabolismo debe iniciarse para permitir la recuperación de los daños estructurales causados por el deshidratado y los procesos oxidativos que ocurren mientras la semilla permanece seca, las actividades celulares basales deben restablecerse, en algunas especies se debe superar la dormición, y el embrión debe prepararse para la emergencia y el posterior crecimiento de la plántula. Mientras que el ingreso de agua a la semilla es un proceso rápido, el reinicio de la actividad metabólica es más gradual, pero comienza desde el mismo momento en que las semillas incorporan una pequeña cantidad de agua en sus células, suficiente para que la matriz húmeda del citoplasma pueda llevar a cabo las reacciones químicas necesarias. Se considera que un muy bajo nivel de transcripción y traducción podría ocurrir en una semilla deshidratada. No obstante, más de 12000 ARN mensajeros (ARNm) están presentes en semillas deshidratadas de *Arabidopsis* y cebada (Bewley *et al.*, 2013). Por su parte, en semillas de arroz se detectaron más de 17000 transcritos. Estos mensajeros almacenados sobreviven al proceso de desecación. La mayoría de los genes que codifican estos ARNm contienen secuencias ABRE en sus regiones promotoras y son típicamente activados durante la maduración de las semillas. Es posible que estos ARNm soporten la síntesis proteica durante las primeras etapas de la imbibición, antes que la actividad transcripcional se reactive y nuevos ARNm estén disponibles (Sano *et al.*, 2012). La fase I es una fase de rápida ganancia de agua en la cual se comienza a reparar el daño del ADN (Macovei *et al.*, 2011; Weitbrecht *et al.*, 2011). Un evento temprano durante esta fase es la reasunción del metabolismo energético. Las reacciones de oxidación mitocondrial se incrementan en tanto la imbibición se completa durante la fase II, a medida que las mitocondrias se reparan y/o replican (Howell *et al.*, 2006). La Glicólisis, la Vía de las Pentosas Fosfato y, en algunos casos, las enzimas fermentativas, se activan también durante la imbibición. Estudios moleculares han determinado que una creciente actividad de transcripción se produce durante la absorción hídrica, especialmente en la última parte de la fase I y durante la fase II, y esto sería necesario para que la germinación se complete adecuadamente (Howell *et al.*, 2009; Dinkova *et al.*, 2011). Durante la fase II se inicia además la movilización de reservas. La fase III es la etapa posgerminativa en

la cual la radícula ya emergida comienza su crecimiento. Aunque la movilización de las reservas podría no ser necesaria para la germinación, constituye uno de los eventos más críticos, proveyendo no sólo precursores sino también energía para los procesos, resultando por lo tanto crucial para la eficiencia de la germinación y el establecimiento de la plántula (Pinfield-Wells *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2013). En el caso particular de soja, durante la germinación de ejes embrionales de semillas maduras se identificaron un total de $\sim 1,58 \times 10^9$ secuencias de ARNm que indicaron la activación temprana de procesos críticos para la germinación, tales como Glicólisis, Ciclo de Krebs, vías de movilización de lípidos y del Ciclo del Glioxilato y remodelación de pared celular. Los resultados también avalan la inactivación del ABA y la sobreexpresión de las vías de Giberelinas, Etileno y Brasinosteroides. En términos generales, las poblaciones de ARNm para la germinación temprana comprendieron dos subpoblaciones distintas: transcritos que son importantes en la maduración tardía (por ej., proteínas abundantes de embriogénesis tardía, LEAs) y transcritos que fueron requeridos para las fases de germinación tempranas. Durante el tiempo evaluado no hubo cambios significativos en el peso seco de los ejes embrionales, indicando que este crecimiento durante la germinación estuvo conducido principalmente por ingreso de agua y expansión (Bellieny-Rabelo *et al.*, 2016). Por otro lado, en un estudio previo, Han *et al.* (2013) analizaron el perfil proteómico en la germinación de semillas enteras de soja, identificando 764 proteínas que fueron agrupadas en 14 grupos funcionales, de los cuales los tres más numerosos correspondieron a proteínas relacionadas al metabolismo, a la biosíntesis proteica y destino celular y proteínas relacionadas a la organización y el ciclo celular.

Biomecánica de la germinación.

Desde una perspectiva biomecánica, la germinación es un proceso de fuerzas contrapuestas, siendo necesario alterar el equilibrio entre ambas para que la germinación sea posible (Steinbrecher y Leubner-Metzger, 2016). Por un lado, se requiere un aumento en el potencial de crecimiento del embrión y por otro, la emergencia de la radícula a través de las cubiertas seminales podría ser facilitada por el debilitamiento enzimático o físico de las paredes celulares de las mismas (Nonogaki, 2006).

a- Debilitamiento de las envolturas seminales.

En semillas tales como tomate, tabaco, pimiento, lechuga, melón y chamico, la presencia de un endosperma vivo provee, por un lado, reservas para el crecimiento posgerminativo y por otro, controla el ritmo de la germinación, ya que al rodear completamente al embrión actúa como un impedimento físico a la expansión del eje embrional. El debilitamiento del endosperma micropilar es un prerrequisito para la protrusión radicular en semillas de este tipo (Bradford y Nonogaki, 2007). Existen varios estudios sobre el debilitamiento del endosperma micropilar por efecto de enzimas hidrolíticas como la Xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa, β -glucanasas y endo β -mananasas, o por acción de otras proteínas de pared celular como las Expansinas (Chen *et al.*, 2002). También se ha reportado la modificación química de las paredes celulares por acción de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) para el caso de semillas de *Lepidium sativum* (Nonogaki, 2010).

Por otra parte, semillas como soja, *Brassica napus* y arveja, en las cuales el endosperma es ocluido por el embrión en desarrollo, presentan una germinación que solamente comprende la ruptura de las cubiertas seminales que precede a la aparición de la radícula. Son poco conocidos los procesos bioquímicos y mecánicos que conducen a la ruptura de la cubierta seminal, la cual ocurre frecuentemente en las proximidades de la micrópila (Fig. 3).

b- Potencial de crecimiento del embrión.

Mientras que el debilitamiento de los tejidos que rodean al embrión es un prerrequisito para muchas semillas, la generación del potencial de crecimiento del embrión es la condición fundamental para que la germinación se realice. La absorción de agua por el embrión durante la imbibición constituye la fuerza motriz

que permite desarrollar este potencial de crecimiento. El mecanismo implicado comprende el alargamiento de las células presentes en el eje embrional producto del ingreso de agua al mismo. Esto puede producirse mediante la relajación de las paredes celulares y/o por disminución del potencial osmótico del embrión conducido por el incremento de la concentración de pequeños metabolitos. Se trata de un proceso netamente expansivo, con antecedentes demostrados en ciertas especies de ausencia de eventos de división celular o mitosis. Por ejemplo, semillas de *Medicago truncatula* incubadas en presencia de Orizalina, un compuesto que inhibe la metafase mitótica, mostraron que la división celular no fue requerida para permitir la emergencia de la radícula (Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). Adicionalmente, Sliwinska *et al.* (2009) mostraron que la elongación de las células del embrión que define la germinación en semillas de *Arabidopsis thaliana* no ocurre dentro de la radícula en sí, sino dentro de una región discreta correspondiente a la zona de transición radícula-hipocótilo definida como zona de elongación (ZE), indicando un aumento de tamaño, pero no en número para las células presentes en dicha zona. De esta manera, la estructura rígida de las paredes celulares, junto con las características osmóticas del protoplasto gobiernan las propiedades mecánicas de las células, tejidos y órganos, siendo responsables, entre otros procesos, de que la germinación se complete. En respuesta al alargamiento celular, las células vegetales ajustan la extensibilidad de sus paredes celulares mediante la remodelación de los principales componentes de la pared (Steinbrecher y Leubner-Metzger, 2016).

Debilitamiento de pared y expansión celular.

La pared celular determina la forma celular, mantiene a las células juntas, provee estiramiento y rigidez mecánica esencial, actúa como una barrera crítica contra los patógenos y, junto con la presión de turgencia generada por la absorción de agua dentro de la vacuola, proveen estabilidad a la planta. Las paredes celulares son capaces de soportar fuerzas mecánicas grandes que surgen a partir de la presión de turgencia celular. Al mismo tiempo, su flexibilidad permite la extensión controlada e irreversible de la pared y la relajación del estrés a medida que la célula crece, reduciendo la turgencia celular y creando por lo tanto la fuerza conductora necesaria para la absorción de agua y el alargamiento físico de la célula. Este proceso, que comienza con el debilitamiento selectivo de pared, permite a las células vegetales crecer más de 100 veces su tamaño meristemático inicial y requiere la síntesis e incorporación de nuevos componentes estructurales dentro de las paredes en crecimiento para prevenir la pérdida de integridad mecánica de las mismas (Cosgrove, 2001; Darley, *et al.*, 2001; Sampedro y Cosgrove, 2005).

A pesar de su diversidad, todas las paredes celulares poseen una composición basada en microfibrillas de celulosa rígidas y tensionalmente fuertes, las cuales están entrecruzadas a una matriz consistente de hemicelulosa y/o pectina, proteínas estructurales y, en ciertos tipos celulares, lignina. En la mayoría de los casos, las microfibrillas de celulosa están altamente orientadas, creando una anisotropía mecánica en la pared que determina a su vez la dirección de crecimiento de la célula. Este crecimiento depende del balance de fuerzas entre la extensibilidad de la pared y la fuerza mecánica ejercida por la presión de turgencia de las células. Más en detalle, la expansión celular resulta del delicado balance entre la relajación y la rigidización de la pared ligado por un mecanismo cíclico de mecanosensado (Wolf *et al.*, 2012) el cual ocurre vía reorientaciones estrictamente reguladas de cada uno de los componentes de pared que permiten, primero, que la pared se estire en direcciones específicas y luego la bloquean en su forma final (Carpita y Gibeaut, 1993). Este conocimiento llevó a desarrollar un modelo que determina que el crecimiento del embrión durante la germinación depende principalmente de los cambios en la extensibilidad de la pared celular. Estos cambios van acompañados de una progresiva vacuolización celular durante la fase II tardía. Una vez que las paredes celulares están relajadas, la disminución del potencial osmótico determina

el ingreso de agua; para ello, la temprana movilización de reservas podría contribuir con solutos hacia el embrión y así generar el potencial de crecimiento necesario para la germinación (Bradford y Nonogaki, 2007). Las modificaciones específicas que facilitan el debilitamiento de la pared celular para promover el crecimiento del embrión son desconocidas, aunque las Expansinas, Xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa (XTH) y la Celulasa estarían involucradas. Dada la compleja composición de la pared celular, es probable que la acción concertada de varias enzimas modificadoras y proteínas aporten su acción para el debilitamiento de la pared celular (Bradford y Nonogaki, 2007). No obstante, aunque la actividad lítica sería esperable como causa de debilitamiento de pared, las proteínas Expansinas quedaron demostradas como el catalizador de debilitamiento de pared más potente, las cuales carecen de actividad lítica detectable, con enigmas aún presentes sobre su funcionamiento a nivel molecular (Cosgrove, 2016).

Proteínas Expansinas.

En el debilitamiento de la pared durante el alargamiento celular, los polímeros de la matriz que cubren las microfibrillas y las mantienen en su lugar se apartan unos de otros por deslizamiento y permiten el crecimiento expansivo de la célula debido al influjo de agua al interior de la vacuola. Las paredes de las células vegetales en crecimiento típicamente crecen más rápido a pH bajo (“crecimiento ácido”). Esta extensión inducida por ácido requiere de proteínas Expansinas, cuya acción es referida como “debilitadoras de pared”. Cuatro líneas de evidencia soportan la idea que las Expansinas son reguladores endógenos clave del alargamiento celular vegetal: 1- inducen la relajación de estrés y extensión de paredes celulares aisladas de una manera pH-dependiente. Ninguna otra proteína fue encontrada con esta actividad; 2- la aplicación de Expansinas a células vivas estimula el alargamiento celular; 3- los genes de *Expansina* se expresan en el lugar y tiempo correcto para controlar el crecimiento y; 4- la reducción de la expresión de los genes de *Expansina* por métodos antisentido inhiben el crecimiento (Cosgrove, 2000). Las Expansinas están codificadas por grandes familias multigénicas, las cuales comparten sólo un 20-40% de identidad unas con otras y existen en todos los organismos vegetales examinados, desde briófitas a angiospermas. Cuatro familias de Expansinas son comúnmente reconocidas en plantas, designadas, desde la más grande a la más pequeña, α -Expansinas (EXPA), β -Expansinas (EXPB), Expansinas-like A (EXPLA) y Expansinas-like B (EXPLB) (Kende *et al.*, 2004; Sampedro y Cosgrove, 2005). Las proteínas Expansinas maduras son de ~25-27 kDa (250-275 aminoácidos) y consisten de un dominio N-terminal (~120 aminoácidos) con similitud estructural y de secuencia a la familia-45 de proteínas Glicósido Hidrolasas (GH45, la mayoría de las cuales son β -1,4-D-endoglucanasas fúngicas) y un dominio C-terminal (~98 aminoácidos) que está distantemente relacionado a los alérgenos del polen grupo II de gramíneas y cuya función hipotética, basada en sus residuos de superficie aromáticos y polares, es la de unión a polisacáridos (Cosgrove, 2000). Ambos dominios, precedidos por un péptido señal (22-25 aminoácidos), forman una larga superficie plana abierta con residuos polares conservados que podrían establecer enlaces hidrógeno con polisacáridos y cuatro residuos aromáticos conservados que podrían unir anillos de azúcares por fuerzas de Van der Waals (<http://www.bio.psu.edu/expansins/>). Se ha demostrado que las proteínas EXPA y

EXPB causan el debilitamiento y extensión de pared, en tanto ninguna función ha sido aún establecida para los miembros de las familias EXPLA y EXPLB. La expresión localizada de las Expansinas está asociada con los meristemas y las zonas de crecimiento de la raíz y el tallo, al igual que con la formación de primordios foliares en los meristemas apicales del vástago y el crecimiento de las paredes celulares de la epidermis durante la formación de los pelos de raíz. Adicionalmente, las Expansinas están implicadas en otros procesos de desarrollo durante los cuales ocurre el debilitamiento de pared tales como el ablandamiento de frutos (Brummell *et al.*, 1999; Dotto *et al.*, 2006), la formación de xilema (Gray-Mitsumune *et al.*, 2004), la senescencia foliar (Belfield *et al.*, 2005), germinación de semillas (Chen y Bradford, 2000), penetración del tubo polínico a través del estigma y el estilo (Pezzotti *et al.*, 2002), formación de asociaciones micorrízicas con hongos simbióticos en los tejidos de la raíz (Balestrini *et al.*, 2005), desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas (Giordano y Hirsch, 2004), desarrollo de plantas parasíticas (Wrobel y Yoder, 2001) y resurrección de plantas por rehidratación y elongación prolongada frente a la sumersión como respuesta adaptativa al ambiente acuático en algunas plantas (Jones y McQueen-Mason, 2004). El mecanismo exacto por el cual las Expansinas causan el debilitamiento y extensión de las paredes celulares es aún enigmático. Por un lado, existen evidencias que éstas rompen los enlaces no covalentes que unen los polisacáridos de matriz a la superficie de las microfibrillas de celulosa. Por otra parte, no se ha encontrado ninguna actividad hidrolítica ni enzimática causada por el efecto de las Expansinas sobre la pared celular. El efecto físico que produce incluye la inducción rápida de la extensión de pared y la estimulación de la relajación de estrés, sin cambios duraderos en la pared, excepto que esta es más larga y delgada después de la extensión (Cosgrove, 2000). Las Expansinas actúan muy rápidamente (segundos) y en cantidades catalíticas, sin afectar la plasticidad o elasticidad de las paredes celulares. Todas las EXPAs caracterizadas hasta el momento tienen un pH óptimo para la extensión de pared celular de alrededor de 4. Esta situación permite a la célula regular su actividad modulando el pH de la pared a través de la acción de bombas H^+ -ATPasas de membrana plasmática. Por otro lado se sabe que, tanto EXPAs como EXPBs son activadas por agentes reductores; esto también podría ser biológicamente significativo, dado que el potencial redox de la pared celular puede ser modulado por el transporte de electrones a través de la membrana plasmática (Cosgrove, 1998;

Cosgrove, 2000; Kende *et al.*, 2004; Sampedro y Cosgrove, 2005; Cosgrove 2016; Steinbrecher y Leubner-Metzger, 2016). Se han identificado diferentes Expansinas relacionadas con la germinación de semillas en varias especies, con comportamientos variables tanto en su expresión como en los mecanismos de control durante el proceso. Por ejemplo, dos genes de *Expansinas* (*LeEXPA8* y *LeEXPA10*) se encontraron expresados previo a la protrusión radicular durante la germinación de semillas de tomate. En *Arabidopsis*, las Expansinas están entre los genes que más tempranos son sobreexpresados siguiendo a la imbibición (Bradford y Nonogaki, 2007). Análogamente, en *Medicago truncatula*, se observó la inducción de la expresión de un gen de Expansina durante las primeras horas de incubación en agua y la represión en presencia de ABA, indicando que la expresión de las *Expansinas* ocurre previo a la protrusión radicular y está bajo control por ABA en esta especie (Gimeno-Gilles *et al.*, 2009).

Proteínas Expansinas de soja.

Hasta el momento se identificaron en el genoma de soja un total de 75 genes *Expansina*. Todos contienen los dos dominios antes descritos y pertenecen a las cuatro subfamilias de Expansinas conocidas (49 EXPA, 9 EXPB, 2 EXLA y 15 EXLB). Estos genes de *Expansina* fueron mapeados en 18 de los 20 cromosomas, siendo el cromosoma 17 el que mayor número de genes presenta (Zhu *et al.*, 2014). La mayoría de los genes EXPA contienen tres exones, mientras que las restantes subfamilias contienen dos o cuatro. Adicionalmente, la comparación de las estructuras exón-intrón indicó que las subfamilias EXPB y EXLA son más conservadas respecto a las subfamilias EXPA y EXLB. La superfamilia de Expansinas de soja ha sufrido duplicaciones génicas a través de la evolución. Como resultado, contienen múltiples copias que podrían presentar funciones parcial o totalmente solapadas. Los análisis de RNA-Seq en hojas jóvenes, flores, vainas, semillas durante el desarrollo, raíces y nódulos de soja indicaron que muchos genes *Expansina* exhibieron bajos niveles de abundancia de transcritos y la acumulación de los mismos estuvo asociada con los diferentes tejidos. La expresión de las Expansinas de soja podría ser altamente específica y limitada a un único órgano o tipo celular (Zhu *et al.*, 2014). Así, el primer gen de Expansina de soja de raíz identificado fue descrito con un alto nivel de expresión sólo en tejido de raíz, contribuyendo al desarrollo de los pelos radiculares (Lee *et al.*, 2003), en tanto otros

transcriptos de Expansinas se asociaron a la homeostasis de pared celular durante la germinación de estas semillas (Bellieny-Rabelo *et al.*, 2016). La expresión diferencial para las cuatro subfamilias de Expansinas de soja puede estar asociada con la divergencia de las regiones promotoras de dichos genes. Cuatro tipos de elementos que actúan en *cis* fueron encontrados en la región promotora de la superfamilia de genes *Expansina* de soja. El primer tipo de elemento en *cis* enriquecido en la región promotora es el elemento de respuesta a la luz, el cual incluye G-box, Box 4 y Box I. Otra clase de elementos que actúa en *cis* es el elemento de respuesta a hormona, incluyendo a Ácido Salicílico (elemento-TCA) y Auxinas y Giberelinas (elemento-TGA y motivo GARE), indicando que estas hormonas regulan la expresión de algunos genes *Expansina* de soja. La tercera clase de elemento más abundante contiene elementos que responden a estreses ambientales, tales como anaerobiosis (ARE) y sequía (MBS). El cuarto elemento abundantemente encontrado comprende elementos involucrados en el control circadiano (Zhu *et al.*, 2014). No se han identificado aún elementos de respuesta a ABA, como tampoco se han caracterizado proteínas Expansinas de germinación en soja (Han *et al.*, 2013). Sin embargo, el conocimiento que la germinación de semillas es producto de la expansión celular, y los antecedentes sobre la inhibición de la germinación de semillas por ABA, afectando el relajamiento y la expansión de la pared celular (Da Silva *et al.*, 2008; Gimeno-Gilles *et al.*, 2009) han quedado claramente demostrados. En este sentido, la función general asignada a las Expansinas como proteínas de debilitamiento de pared celular, proponen un rol primario para estas proteínas durante la germinación de semillas. Adicionalmente, la evidencia del control negativo por ABA sobre la expresión de Expansinas durante la germinación de semillas de *Medicago truncatula* (Gimeno-Gilles *et al.*, 2009), una especie filogenéticamente emparentada con soja, plantea la existencia de proteínas Expansinas implicadas en la germinación de estas semillas, y su posible control por ABA durante el proceso.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Caracterizar el rol del ABA en el control de la expresión de genes que regulan aspectos específicos del programa de germinación de semillas de soja.

Objetivos específicos.

1. Identificar genes vinculados al programa de germinación de semillas de soja.
2. Evaluar la expresión de genes vinculados a la germinación de semillas de soja bajo condiciones de incubación inhibitorias por ABA.
3. Establecer la relación entre la evolución de la concentración endógena de ABA y el grado de expresión de genes involucrados en el programa de germinación durante el desarrollo.

Hipótesis y Predicciones.

- La germinación de semillas de soja no implica eventos de división celular; es un proceso netamente expansivo, producto del debilitamiento y relajamiento de las paredes celulares en la zona de elongación (ZE) del eje embrional, en respuesta al ingreso de agua durante la imbibición.
- El ABA impide la transición entre las fases II y III de imbibición, inhibiendo en consecuencia, la germinación de semillas de soja.
- Los genes responsables del proceso de relajamiento de paredes celulares que definen la germinación de semillas de soja, serían controlados por ABA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo Experimental.

El tegumento es la única cubierta seminal en semillas de soja y es un tejido muerto a la madurez luego de la desecación. La pérdida de su naturaleza dura como consecuencia del síndrome de domesticación en esta especie (Sakamoto, *et al.* 2004; Doebley *et al.*, 2006) evita que este tejido constituya *per se* un impedimento para la germinación de semillas maduras de soja. Por otra parte, durante el desarrollo previo a la deshidratación, el tegumento es un tejido vivo, de estructura, composición y fisiología compleja, con una resistencia a la punción en el área micropilar alta y creciente para semillas de soja desde 25 a 45 DDA (Montechiarini *et al.*, 2015). Su presencia determina también la existencia del apoplasto interfacial, delimitado entre éste y el embrión propiamente dicho. El apoplasto interfacial constituye un espacio dentro del cual son descargados desde la planta madre los asimilados; fundamentalmente una solución concentrada de sacarosa de $\Psi_a \sim -1$ MPa, que nutren al embrión durante su desarrollo. En trabajos previos demostramos que estas características confieren al tegumento la propiedad de operar como una barrera restrictiva para la germinación de semillas inmaduras de soja, tanto estableciendo una resistencia mecánica a la protrusión radicular como reduciendo osmóticamente la capacidad de imbibición (Montechiarini *et al.*, 2012; Montechiarini *et al.*, 2015). Sin embargo, desde el punto de vista de la biomecánica de germinación, si bien la naturaleza físico química del tegumento de semillas inmaduras de soja podría ejercer algún efecto sobre la germinación de estas semillas, no existen antecedentes que indiquen que la ruptura del tegumento durante la germinación esté relacionada con regulador/es fisiológico/s. Por el contrario, ha quedado claramente demostrado que la inhibición de la germinación en semillas inmaduras de soja se relaciona con los elevados niveles de ABA presentes en el eje embrional (Gosparini *et al.*, 2007). Similarmente, las semillas de soja madura, en las cuales los niveles de ABA endógeno se encuentran por debajo del umbral inhibitorio, son incapaces de germinar bajo incubación en presencia de ABA exógeno. En este sentido, la regulación hormonal opera retrasando o aún impidiendo la capacidad del embrión de desarrollar el potencial de crecimiento necesario para la germinación. Específicamente, el ABA impide el debilitamiento y la relajación de las paredes celulares del eje embrional en respuesta a la presión de turgencia celular generada

como consecuencia del ingreso de agua durante la imbibición, manteniendo a las semillas en fase II e impidiendo la emergencia radicular. Los mecanismos moleculares implicados en esta regulación son aún desconocidos en semillas de soja. No obstante, las biomoléculas que conducen estos procesos de debilitamiento y relajación de paredes celulares y dan lugar a los eventos de expansión y alargamiento celular, tales como las proteínas Expansinas, serían candidatos clave de regulación de la germinación por ABA en semillas de soja. Por lo tanto, los ejes embrionales aislados de semillas de soja constituyen un modelo apropiado de trabajo, permitiendo realizar análisis de germinación libre de las posibles interferencias debidas al tegumento y describiendo el proceso haciendo foco estrictamente en el principal tejido blanco.

Condiciones de cultivo y selección del material vegetal.

Semillas de soja, cv. Williams 82, Grupo de Madurez III, se sembraron en recipientes de 0.8 dm³, conteniendo una mezcla de tierra húmifera - perlita (3:2, v/v). Se sembraron en cada recipiente cuatro semillas previamente tratadas con fungicida Tiabendazol, (2-(4-tiazolin)-benzimidazol). Al estado de hojas unifolioladas expandidas se raleó a dos plantas por maceta. Según las fechas de siembra para los diferentes experimentos, las plantas fueron cultivadas en condiciones ambientales o de invernáculo, manteniendo por subirrigación un adecuado nivel hídrico durante todo el período de cultivo. Semanalmente se realizaron de modo preventivo tratamientos sanitarios. La etapa vegetativa tuvo una duración variable, acorde a la fecha de siembra. No obstante, por corresponder el cv. a un grupo de madurez corto, dicha etapa varió entre 30 a 40 días postemergencia. Una vez que las plantas alcanzaron la floración (antesis), se realizaron observaciones diarias durante todo el período. La edad de las semillas en desarrollo se determinó como los días después de la antesis (DDA). La edad cronológica de los frutos se determinó marcando el cáliz de las flores que alcanzaron la antesis en el mismo día con el mismo color. Cada color correspondió a una determinada edad, e identificó, por lo tanto, frutos de crecimiento simultáneo (igual edad). Se utilizaron frutos inmaduros de 25, 30, 35 y 40 DDA, y frutos maduros, tanto en madurez fisiológica (MF, 45 DDA) como maduros y secos (> 60 DDA). Durante el crecimiento y desarrollo de los frutos, se eliminaron, dentro de un mismo nudo, aquellos frutos sin marca (edad inferior a la asignada por el color). Esto permitió dar prioridad al desarrollo de los frutos marcados,

proporcionando condiciones de crecimiento óptimas y uniformes a semillas de igual edad.

De acuerdo al objetivo de cada uno de los experimentos, se evaluaron, alternativamente, semillas enteras y ejes embrionales. Las semillas se extrajeron bajo cámara de flujo laminar y se desinfectaron superficialmente con NaClO 0,5% p/v, seguido de dos lavados con agua destilada estéril. Los ejes embrionales se obtuvieron bajo las mismas condiciones, a partir de la disección con bisturí estéril de las semillas, a las cuales se les eliminó el tegumento y ambos cotiledones.

Condiciones de incubación de ejes embrionales.

Los ejes embrionales aislados de semillas de soja fueron incubados a 27 ± 1 °C y oscuridad, en cajas de Petri sobre tres papeles de filtro saturados con 3 ml de la correspondiente solución de estudio. La edad y cantidad de ejes embrionales incubados y el tiempo de incubación dependieron de las necesidades y/o condiciones indicadas para cada experimento. Los medios de incubación analizados fueron: agua destilada estéril, soluciones de ABA de diferentes concentraciones (Rango: 6,25; 100 μ M), soluciones de PEG 8000 de diferentes Ψ_a (Rango: -0,125; -1,5 MPa ; Michel, 1983), solución buffer pH8, solución de α -Amanitina 100 μ M y solución de Cicloheximida 100 μ M. Para cada condición, el medio de incubación fue renovado diariamente por reposición.

Ensayos de germinación.

Tres réplicas de diez ejes embrionales o diez semillas de soja se incubaron a 27 ± 1 °C y oscuridad, en cajas de Petri sobre tres papeles de filtro saturados con agua destilada estéril u otras soluciones de germinación (indicadas para cada experimento). La edad de las estructuras incubadas dependió del objetivo específico de cada experimento. El tiempo máximo de incubación fue 168 h, en tanto los tiempos de evaluación de germinación difirieron para cada experimento. Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula protruyó el tegumento. Para el caso de los ejes embrionales, se consideró germinación cuando se observó un alargamiento > 2 mm de su longitud inicial. El porcentaje de germinación (%G) se calculó como: n° acumulado de estructuras germinadas * 100 / n° estructuras totales incubadas. El tiempo en el cual se alcanzó el 50 %G (t_{50}) fue utilizado como un estimador de la velocidad de germinación en cada caso.

Determinaciones de peso fresco.

Se pesaron diez muestras (ejes embrionales o semillas) de soja, al inicio de cada tratamiento (t_0) y en cada uno de los siguientes tiempos de incubación especificados según el experimento (t_i) previo secado superficial de las mismas en papel absorbente. Se utilizó una balanza Precisa 205 A SuperBal – series, con un nivel de precisión de 10^{-5} g. La evolución de la ganancia de agua fue referida como volumen de agua (μl) por eje embrional o semilla, según sea la situación. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Visualización del alargamiento celular.

Por medio de un diseño propio de captura de imágenes se siguió la evolución de la germinación de ejes embrionales de semillas maduras y secas de soja, lo que permitió definir la zona de elongación (ZE) estrictamente involucrada en dicho proceso. Para ello, los ejes embrionales fueron marcados con tinta indeleble a lo largo de su estructura por medio de puntos equidistantes, previo a su incubación. La elongación de los ejes durante la incubación se evaluó superficialmente a partir de los cambios tanto en la longitud de espaciamiento entre marcas como en la forma de las mismas (ensanchamiento). La captura de imágenes se realizó con cámara fotográfica Sony DSC-W150.

Estudios por Rayos X del ingreso de agua al eje embrional durante la incubación.

Se realizaron capturas radiográficas de ejes embrionales de soja maduros y secos a diferentes tiempos de incubación en agua destilada estéril. La absorción de agua durante la incubación se visualizó a partir de contrastes en el revelado y tuvo por objetivo identificar/ localizar las zonas de mayor concentración de agua durante la germinación. La observación en serie permitió a su vez evaluar la dinámica de absorción hídrica durante la germinación. Las determinaciones se realizaron utilizando un equipo SEMAX, desarrollado por el Laboratorio de Tecnología de Semillas de la Estación Experimental INTA Oliveros y la empresa TEXEL. El procesamiento y análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa VixWin 2000 (Gendex Dental Systems, www.gendex.com/software-drivers), que identifica zonas de densidad semejante.

Observaciones histológicas del alargamiento celular.

Ejes embrionales de semillas de soja previo y durante distintos tiempos de incubación en agua destilada estéril fueron fijados en solución Carnoy, deshidratados en serie ascendente de alcoholes, sumergidos en combinaciones sucesivas de alcohol 100°- xilol, xilol- parafina y por último en parafina pura a 60 °C para ser montados finalmente en bloques sólidos. De acuerdo al protocolo experimental, se utilizaron ejes en MF (45 DDA), cuya composición tisular fresca e hidratada, garantizó la correcta ejecución de las sucesivas etapas procedimentales. Los bloques fueron cortados con micrótopo (10 µm de espesor), y los cortes fueron desparafinados en xilol a 40 °C, llevados a alcohol 100° y finalmente teñidos en solución alcohólica de colorante Fast Green. Las observaciones histológicas se realizaron con microscopio óptico (Leica ICC50). Se midió la longitud de las células correspondientes a la ZE para cada uno de los tiempos de incubación, empleando el software de adquisición de imágenes LASCZ 3.4 (<https://www.leica-microsystems.com/es>).

Estudios histológicos del alargamiento celular por microscopía confocal y electrónica.

Se realizaron observaciones histológicas “*in vivo*” de ejes embrionales de soja durante la incubación en condiciones de germinación. La edad de los ejes embrionales (45 DDA) seleccionada tuvo en cuenta las características de tejido necesaria (tejido fresco, hidratado) para las observaciones microscópicas correspondientes y, en el caso de la técnica de microscopía confocal, el contenido de clorofila natural que evitó la necesidad de tinción de los ejes embrionales. Se midió la longitud de las células comprendidas en la ZE en diferentes momentos de la incubación, previo y posterior a la elongación del eje embrional. Estas determinaciones se efectuaron mediante los softwares de procesamiento y análisis de imágenes provistos para los correspondientes microscopios. Las observaciones por microscopía confocal se realizaron en microscopio Nikon C1 plus confocal microscope mounted on Eclipse TE-2000-E2 inverted microscope con sistema de iluminación láser. La longitud de onda de trabajo correspondió a la de la intensidad de fluorescencia de la clorofila contenida en los ejes embrionales en estudio. Las observaciones por microscopía electrónica se efectuaron en microscopio Electrónico de barrido ambiental SEM FEG FEI Quanta200 con sistema de operación en vacío.

Extracción y análisis de ABA.**-Extracción y preparación de muestras.**

La cuantificación de ABA se efectuó siguiendo el protocolo desarrollado por Vernieri *et al.* (1989a) y validado para estructuras seminales de semillas inmaduras de soja por Gosparini *et al.* (2007). A cada tiempo de incubación, se colocaron 10 ejes embrionales por edad en tubos Eppendorf de polipropileno de 1,5 ml debidamente rotulados (edad y tiempo de incubación correspondiente). Las muestras fueron inmediatamente congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -70 °C. Posteriormente fueron liofilizadas y se determinó el peso seco correspondiente, conservándose a -70 °C hasta el momento de la determinación de ABA.

-Extracción de ABA.

Se añadieron a cada tubo Eppendorf 500 µl de agua destilada y se dejó en reposo, a temperatura ambiente durante 3 h; a continuación se congelaron en N₂ líquido, propiciado de esta manera el estallido celular, e inmediatamente se llevaron a temperatura ambiente para un descongelamiento lento. Una vez descongelados, los extractos se mantuvieron a 4 °C y oscuridad durante toda la noche, para favorecer la difusión de los contenidos celulares (entre ellos, el ABA) hacia la solución acuosa.

-Cuantificación de ABA.

Se llevó a cabo mediante el método de radioinmunoanálisis, RIA, en fase sólida, utilizando el anticuerpo monoclonal, DBPA1 disuelto en buffer PBS pH7,4 (Na₂HPO₄ + KH₂PO₄ + NaCl + KCl), que presenta muy alta afinidad por la molécula libre de S-(+)-ABA (Vernieri *et al.*, 1989a). En algunos casos, el extracto crudo debió ser diluido de manera que su contenido de ABA se ubicara dentro del rango de concentraciones de la curva de calibración utilizada (15 a 1000 pg ABA/50 µl). La reacción inmunológica se realizó en placas flexibles de vinilo con fondo en U, de 96 celdas (Dynatech). Las paredes de las celdas fueron recubiertas con el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón (Sigma) disuelto en solución de NaHCO₃ 50 mM pH9,6 con el objeto de facilitar el ligamiento del anticuerpo monoclonal DBPA1, agregado posteriormente. Cada incubación con las respectivas soluciones de anticuerpos se realizó durante toda la noche, manteniendo las placas en cámara húmeda a temperatura ambiente, y el exceso de anticuerpo no ligado a las celdas se eliminó con solución de lavado (PBS pH7,4 + 0,1 % Tween 20). Posteriormente, se

agregaron en cada celda 50 μ l de extracto crudo y 50 μ l de solución de ABA ($[^3\text{H}]$ -R, S-(\pm)-ABA disuelto en PBS pH7,4) (Amersham) con una actividad aproximada de 10000 cpm. Las placas se incubaron durante 40 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ para permitir la reacción de competencia y a continuación se eliminó el excedente. Las celdas fueron lavadas y escurridas vigorosamente, cortadas y colocadas en tubos Eppendorf (una celda/tubo), a los que se agregó 500 μ l de líquido de centelleo (Optiphase 'HISAFE'3, Perkin Elmer). Estos tubos Eppendorf fueron a su vez colocados dentro de tubos de vidrio de 20 ml y medidos en un contador de centelleo líquido Packard Mod. 1600. Para cada placa utilizada se construyó la correspondiente curva de calibración, a partir de soluciones estándares de concentraciones conocidas de S-(+)-ABA (15,6; 31,3; 62,5; 125; 250; 500 y 1000 $\text{pg}/50 \mu\text{l}$). Para la preparación de las soluciones estándares se utilizó la mezcla racémica R, S-(\pm)-ABA (Sigma), por lo que las mismas se utilizaron al doble de la concentración indicada, dado que el anticuerpo monoclonal DBPA1 sólo reconoce la forma natural S-(+)-ABA. Se realizaron tres repeticiones por muestra en estudio. Las determinaciones de ABA para cada muestra se hicieron por duplicado. El contenido de ABA del extracto se calculó a partir de la curva de calibración, interpolando el valor de radioactividad de las muestras (cpm) leídas en el contador de centelleo líquido.

Diseño de cebadores para aislamiento e identificación de genes Expansina implicados en la germinación de soja.

Se analizaron secuencias correspondientes a proteínas Expansinas, tanto en soja como en otras especies y que estuvieran o no relacionadas al proceso de germinación de semillas. Adicionalmente, se analizaron y seleccionaron genes de soja (Li *et al.*, 2012; Tabla 1) que pudieran ser utilizados como referencia en estudios de expresión por Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR). Se diseñaron cebadores directo y reverso para secuencias de Expansina putativas, tanto para su aislamiento por técnicas de PCR convencional como para los correspondientes análisis de expresión en tiempo real. Se consultaron las siguientes bases de datos: NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PlantGDB (www.plantgdb.org/), Soykb (<http://soykb.org/>), Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>), SoyBase (<https://soybase.org/>). Las herramientas bioinformáticas utilizadas comprendieron: análisis de homología de secuencias Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), alineamientos de secuencias (multalin.toulouse.inra.fr/multalin/), búsqueda de bases de datos de familias génicas en la

especie en estudio (*Glycine max*), análisis filogenético de secuencias (programas: TRIMAL, PhyML, FigTree), análisis de dominios de secuencia conservada, diseño de cebadores con homología de secuencia consenso (programas: Sequencher; PRIMER 3 (Rozen and Skaletsky, 2000)).

Extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN fue hecha de acuerdo a Saghai-Marooof *et al.* (1984) con las siguientes modificaciones. El tejido correspondiente a un folíolo (~ 500 mg) fue congelado en N₂ líquido, pulverizado e incubado en un volumen de buffer de extracción (2% CTAB, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl pH8, 1.4 M NaCl, 0.4% β-mercaptoetanol, PVP), por 30 min a 65 °C. Las muestras fueron tratadas dos veces con un volumen de cloroformo a -20 °C. Posteriormente se removió la fase acuosa superior y se incubó en presencia de 2 volúmenes de Etanol Absoluto durante toda la noche a -20 °C. El ADN fue precipitado por centrifugación y lavado en Etanol 75% / 0,2 M de Acetato de Sodio y secado a 37 °C al menos 1 h. El ADN fue resuspendido en 100 µl de buffer TE pH8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.02 M) tratado con RNAsa A (0.25 mg/ml), 2 h a 37 °C. Finalmente, las muestras fueron precipitadas en NaCl 5% v/v y 2,5 volúmenes de Etanol Absoluto a -20 °C, e incubadas durante la toda noche a -20 °C. El ADN se lavó con Etanol 75%, se precipitó por centrifugación y se secó a 37 °C durante 1 h. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 100 µl de agua tridestilada estéril y conservado a -20 °C.

Extracción de ARN total.

Los ejes embrionales fueron seccionados transversalmente con bisturí en tres porciones, agrupadas en dos regiones, correspondientes a la zona de elongación (ZE) y ambos extremos (E), plúmula + radícula. Las respectivas zonas (E y ZE), fueron inmediatamente congeladas en N₂ líquido y conservadas a -80 °C hasta el momento de extracción del ARN total. La extracción de ARN total se realizó a partir de ~ 30 mg de tejido y se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez extraídos, los ARN totales fueron conservados a -70 °C en un volumen final de 100 µl.

Determinación de concentración, pureza e integridad de ADN/ARN.

Las estimaciones de concentración y pureza de los ácidos nucleicos se realizaron empleando espectrofotómetro Lambda Bio⁺ (Perkin Elmer), en diluciones 1:50. La pureza de los mismos se determinó como el cociente de Absorbancias: $Abs_{(260/280)} \approx 2$. La integridad del ADN y ARN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa 0,8% y 2%, respectivamente. Las muestras de ADN y ARN fueron sembradas en buffer de siembra 6X (sacarosa, EDTA 0,5 M, Azul de Bromofenol) y se realizó la corrida electroforética a 70 mA, empleando buffer de corrida TAE 1X (Tris clorhídrico - ácido acético - EDTA). El revelado se realizó por tinción con BrEt 0.5 µg/µl. La integridad se determinó a partir de la presencia de una única banda de alto peso molecular (PM) correspondiente al ADN genómico y dos bandas definidas en el caso del ARN, correspondientes a los ARNr 28S y 18S.

Obtención del ADNc a partir de ARN total.

La reacción de transcripción reversa y obtención de la primera hebra de ADNc se efectuó a partir de 1 µg de ARN total utilizando los reactivos y protocolo provisto para SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). El ADNc sintetizado fue conservado a -20 °C.

Identificación, amplificación y análisis de secuencias a partir de ADN genómico.

Las combinaciones de pares de cebadores diseñados para la identificación y aislamiento de genes de Expansina/s en soja, fueron inicialmente testeados en reacciones de polimerización en cadena (PCR) utilizando ADN genómico como molde proveniente de tejido foliar. También fueron analizados los pares de cebadores (Tabla 1) para los genes Glyma05g37470, Glyma08g28550, Glyma18g04130 y UKN2, validados como genes de referencia en soja para reacciones de RT-qPCR (datos no mostrados). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en termociclador TC-PRO (Boeco), y las condiciones de amplificación incluyeron 40 ciclos de reacción con las siguientes especificaciones por ciclo: 3 min 95 °C, 30 seg 95 °C; 30 seg (49 - 51,3 - 52,7 - 55) °C, 1 min 72 °C. Se utilizó el gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores, en el rango de 49 a 55 °C, con la finalidad de incrementar las posibilidades de amplificación. Los productos amplificados se sembraron con buffer de siembra 6X en geles de agarosa 2 %. Se realizó la corrida electroforética a 70 mA, empleando buffer de corrida TAE 1X. El revelado de las muestras se realizó por tinción con BrEt 0.5 µg/µl. La estimación de PM para cada una

de las bandas se determinó a partir de un patrón de PM (100 bp, ladder; Invitrogen), sembrado en simultáneo.

Identificación, amplificación y análisis de secuencias a partir de ADNc.

La presencia de transcritos de Expansinas fue analizada por PCR empleando como molde de reacción el ADNc proveniente de la ZE de ejes embrionales de soja germinados. Se utilizaron las mismas combinaciones de pares de cebadores para Expansinas anteriormente descritos. Las condiciones de PCR (40 ciclos) fueron: 30 seg 95 °C para la desnaturalización; 30 seg 56 °C para la hibridación, 1 min 72 °C para la elongación. El producto de amplificación obtenido, denominado EXPA1-like, fue secuenciado (Macrogen Inc., Korea) y dicha secuencia fue analizada por homología BLAST en banco de genes.

Análisis de expresión de EXPA1-like por reacción de RT-PCR.

Las reacciones de transcripción reversa y amplificación en cadena se llevaron a cabo en un mismo tubo de reacción usando 1 µg de ARN total, empleando el kit Access RT-PCR System (Promega, Argentina), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Ambas reacciones se realizaron en termociclador TC-PRO (Boeco) y comprendieron dos etapas sucesivas. Etapa I: 45 min 45 °C para la obtención de la primera hebra de ADNc, 2 min 94 °C para la desnaturalización. Etapa II (40 ciclos): 30 seg 94 °C para la desnaturalización, 1 min 56 °C para la hibridación, 2 min 68 °C para la elongación, 7 min 68 °C para la elongación final, 15 min 15 °C de mantenimiento. Se incluyeron controles positivo (ARN provisto por el kit) y negativo (sin ARN). Se utilizaron muestras de ARN total de ejes embrionales de semillas en MF y maduros y secos. En MF, se evaluaron tanto la ZE como E de ejes embrionales incubados por diferentes tiempos en agua destilada estéril o soluciones 50 µM de ABA o buffer pH8. En maduros y secos, se analizaron sólo ZE de ejes embrionales incubados en agua destilada estéril o soluciones 50 µM de ABA o PEG ($\Psi_a = -1\text{MPa}$). Los productos de amplificación se identificaron en gel de agarosa 1,5% revelados con BrEt 0.5 µg/µl.

Análisis de expresión de EXPA1-like por reacción de RT-qPCR.

Se midió el nivel de expresión del transcripto EXPA1-like por PCR en tiempo real (RT-qPCR) en muestras de ADNc de ZE de ejes embrionales de semillas de soja. Las edades en estudio, los tiempos y soluciones de incubación variaron según las condiciones para cada experimento. Para EXPA1-like se diseñaron cebadores específicos para RT-qPCR (Tabla 1) y como genes de referencia se evaluaron, Glyma05g37470, Glyma08g28550, Glyma18g04130 y UKN2 (Li *et al.*, 2012; Tabla 1). La selección de los genes de referencia tuvo en cuenta las diferentes condiciones de trabajo analizadas en este trabajo. Los genes Glyma05g37470, Glyma08g28550 fueron identificados como óptimos (expresión más estable) para análisis RT-qPCR de la germinación de semillas de soja, UKN2 para semillas de soja durante el desarrollo, en tanto Glyma18g04130 fue indicado para normalización en muestras de semilla de soja total (Li *et al.*, 2012). Las RT-qPCR se llevaron a cabo usando el termociclador Rotor-Gene Q Series (Qiagen). La reacción contiene Mezcla Real 2X (Biodynamics, Argentina), 10 μ M de cada cebador directo y reverso y 2 μ l de una dilución 1:5 del ADNc en un volumen final de 15 μ l. Se incluyeron también controles negativos (sin ADNc). Las condiciones de cada ciclo de amplificación (40 ciclos) fueron: 15 seg 95 °C para la desnaturalización, 30 seg 58 °C para la hibridación y 40 seg 72 °C para la elongación. Las determinaciones se efectuaron por triplicado (réplicas experimentales) sobre dos réplicas biológicas con sus correspondientes tres réplicas técnicas. De acuerdo a los resultados de expresión analizados para los genes de referencia, el gen Glyma05g37470 fue seleccionado, en base a su estabilidad en las diferentes condiciones evaluadas, para los correspondientes análisis de expresión de EXPA1-like. El nivel de expresión del transcripto de EXPA1-like fue cuantificado para cada una de las condiciones (tiempos de incubación o edades) respecto un dado control (sin incubación o 25 DDA) para cada tratamiento utilizando el software REST 2009 (<https://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>).

Tabla 1. Secuencias de cebadores para amplificación por RT-qPCR y tamaño de producto esperado para Genes de Referencia de soja y ADNc de EXPA1-like.

GEN	Cebador Directo (5'-3')	Cebador Reverso (5'-3')	TAMAÑO PRODUCTO (bp)
Glyma05g37470	TTCCACCTCGCAACCATGAT	CGAAGCAAACCTCCCTCTTGG	82
Glyma08g28550	CTGGGC AAAAAGAACTGAAT	AACTGAACTGACTAACAATTCGG	95
Glyma18g04130	ATCATGAGTGAACAAAAGGTTTC	AGTCTGAAACAAACTCTCGCC	142
UKN2	GCCTCTGGATACCTGCTCAAG	ACCTCCTCCTCAAACCTCCTCTG	79
EXPA1-like	GCCCTTCCTAACAACAATGG	CATGGAACCCTTTGAAATAGC	131

RESULTADOS

El presente trabajo tuvo por objetivo el estudio y caracterización de los eventos que dan lugar a la germinación de semillas de soja, identificando el/los efector/es molecular/es responsable/s de iniciar el proceso y evaluando el control que el Ácido Abscísico (ABA) ejerce en su rol principal de inhibidor de la germinación de estas semillas durante el desarrollo. En este sentido, los resultados fueron analizados y descritos de acuerdo a la edad cronológica de las semillas. Por un lado, para una semilla madura, el control fisiológico por ABA es perdido como consecuencia de su descenso natural a través del desarrollo a niveles no inhibitorios. Sin embargo, la sensibilidad de estas semillas maduras al ABA permite aún su control y hace posible su estudio frente al agregado de ABA exógeno. Por otra parte, las semillas inmaduras, cuyos niveles de ABA endógeno se encuentran por encima de su umbral inhibitorio, constituyen un modelo adecuado para el estudio del control de germinación por ABA de semillas de soja durante el desarrollo.

Dinámica de germinación de ejes embrionales y semillas de soja maduras y secas.

Tal como se describió previamente, las semillas constituyen la unidad de preservación de las espermatófitas, al disponer de todos los tejidos y órganos estructurales e información genética necesaria para la formación y desarrollo de la nueva planta. El proceso de germinación que hace posible la transición de la semilla a su estado adulto está definido sobre el eje embrional, tal como indican los resultados de %G (Fig. 7), analizados en base a la protrusión radicular a través del tegumento en el caso de las semillas enteras, o la elongación (> 2 mm) en el caso de los ejes embrionales aislados. Los ejes embrionales comenzaron a germinar luego de las 6 h de incubación, alcanzando 98 y 100 %G a las 24 y 48 h, respectivamente. Las semillas iniciaron la germinación luego de las 12 h, alcanzando el 5 %G a las 24 h, 95 %G a las 48 h, 98 %G a las 72 h y el 100 %G a las 144 h (Fig. 7). El 50 %G (Fig. 7, línea de puntos) indicó valores de t_{50} de 12 h y 36 h para los ejes embrionales y las semillas, respectivamente.

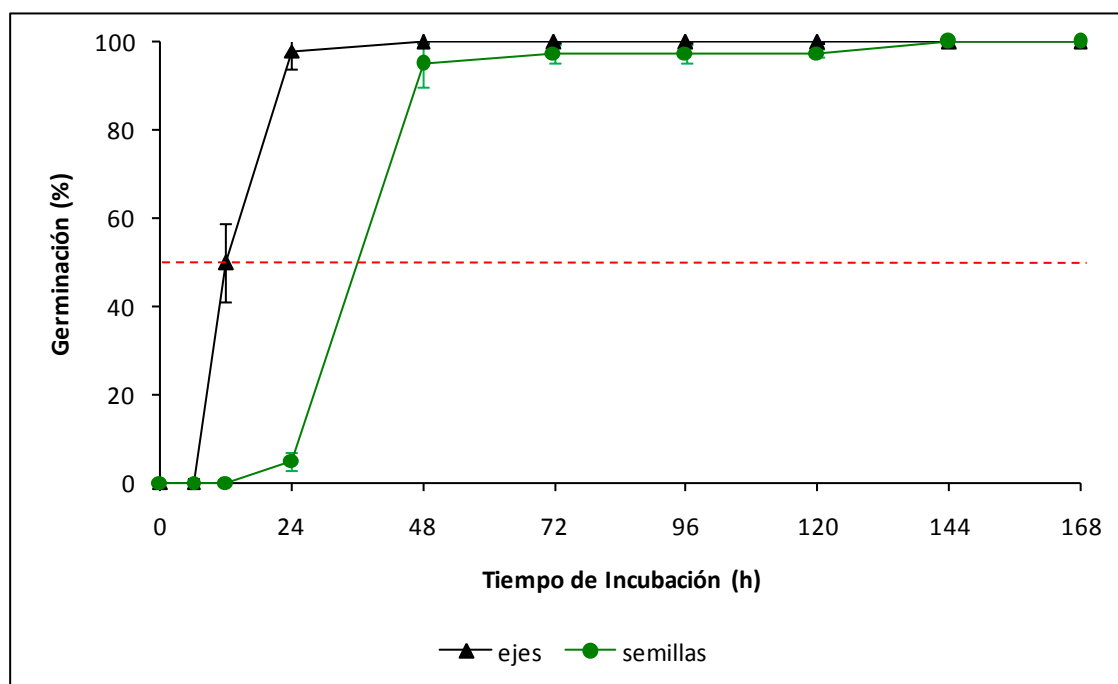


Figura 7. Germinación (%) de ejes embrionales y semillas de soja maduras y secas incubados en agua destilada durante 168 h a 27 ± 1 °C y oscuridad. La línea de puntos corresponde al 50 %G. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 estructuras cada una.

En la Figura 8 se muestran las curvas trifásicas de absorción de agua correspondientes a los mismos ejes embrionales y semillas durante la incubación. Dos características generales distinguen ambas curvas, las cuales explican además las diferencias para ambas estructuras en la Figura 7. En primer lugar, las magnitudes de ganancia de agua durante toda la incubación fueron mayores para las semillas que para los ejes, producto de la diferencia en masa de los órganos considerados. Previo a la incubación, las semillas pesaron, en promedio, 0,148 g, en tanto el peso promedio de los ejes embrionales representó el 3 % del peso total de la semilla (0,0046 g). En segundo lugar, el tiempo que duró cada una de las fases fue también mayor para las semillas respecto a los ejes, como consecuencia de la ausencia de resistencia al flujo de agua que experimentaron los ejes incubados aislados (sin tejidos circundantes) respecto a aquellos en las semillas. La fase I se completó luego de 2 h de incubación para los ejes embrionales, con una ganancia promedio de 6 μl de H_2O por eje, en tanto para las semillas el tiempo fue de 4 h, con una ganancia promedio de 29,6 μl de H_2O por semilla (Fig. 8). La fase II se extendió hasta las 6 y 12 h de incubación para ejes embrionales y semillas, respectivamente; dando lugar a continuación a la fase III, en concordancia con el inicio de la germinación previamente informado (Fig. 7).

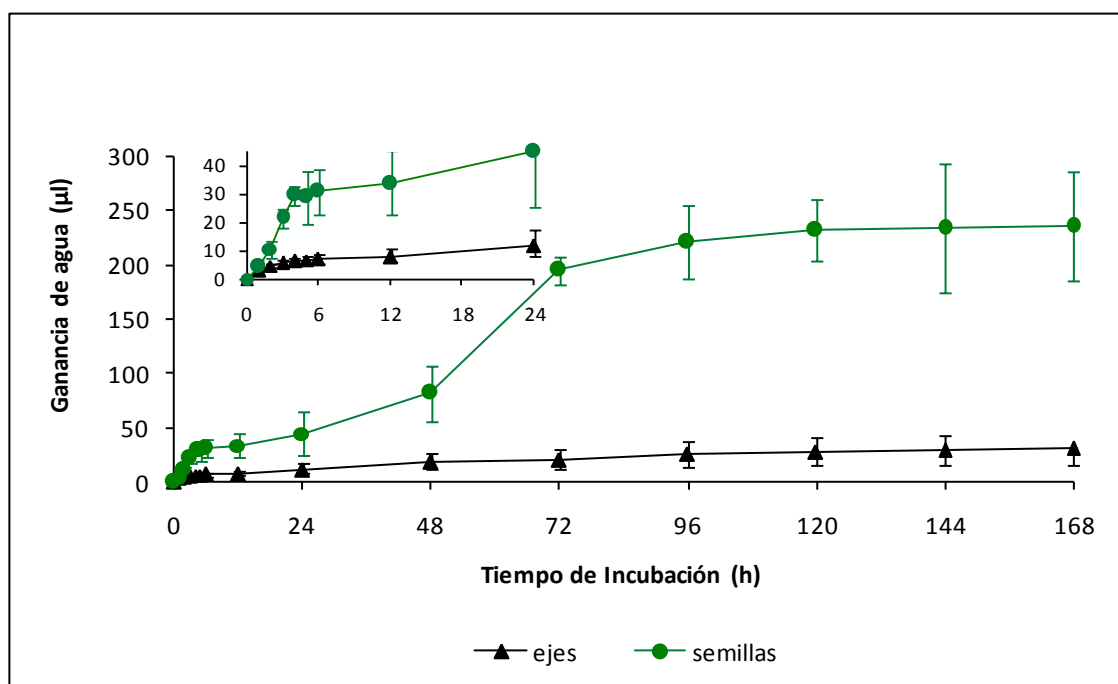


Figura 8. Ganancia de agua (μl) de ejes embrionales y semillas de soja maduras y secas incubados en agua destilada durante 168 h a 27 ± 1 °C y oscuridad. En el inserto se muestran las primeras 24 h de incubación. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 estructuras cada una.

Control de la expansión celular.

Dos situaciones posibles se plantean para explicar la restricción de la absorción hídrica en semillas: debida a un efecto físico, de naturaleza osmótica y/o mecánica o bien; adicional y/o alternativamente, ocasionada por un efector químico/hormonal. En ambos casos, la naturaleza expansiva en que se basa la germinación de ejes embrionales aislados de soja puede ser demostrada cuando éstos, incubados en condiciones que restringen o impiden el ingreso de agua a sus tejidos, retrasan o inhiben su germinación en tanto permanezcan incubados en dichas condiciones.

Restricción osmótica: Incubación de ejes embrionales de soja en soluciones de diferente potencial agua (Ψ_a).

Los valores de germinación (Fig. 9) y las correspondientes dinámicas de absorción hídrica (Fig. 10) para ejes embrionales de soja incubados en soluciones de Polietilenglicol 8000 (PEG) de distintos Ψ_a indicaron una clara restricción en la ganancia de agua y un consecuente retraso en la germinación (inicio de la fase III), tanto mayor cuanto menor fue la disponibilidad de agua libre en el medio de incubación (Fig. 10). La germinación se inició a partir de las 6 h tanto para la incubación en agua destilada (control, $\Psi_a = 0$ MPa) como para las soluciones de $\Psi_a = -0,125$; $-0,25$ y $-0,5$ MPa (Fig. 9). En todos estos casos se registró una ganancia neta de agua durante las 168 h de incubación, con una tasa de absorción mayor cuanto mayor fue el Ψ_a de las soluciones en estudio (Fig. 10). Por el contrario, no hubo germinación en las soluciones de $\Psi_a = -1$ y $-1,5$ MPa (Fig. 9) y se registraron déficits de agua durante gran parte de la incubación en ambos casos (Fig. 10). El 100 %G se alcanzó a las 12 h de incubación en el control, a las 24 h en $-0,125$ MPa y a las 48 h en $-0,5$ MPa, en tanto un máximo de 90 %G se registró en $-0,25$ MPa a las 24 h (Fig. 9). Los valores de t_{50} fueron 6, 6, 10 y 18 h para 0; $-0,125$; $-0,25$ y $-0,5$ MPa, respectivamente (Fig. 9).

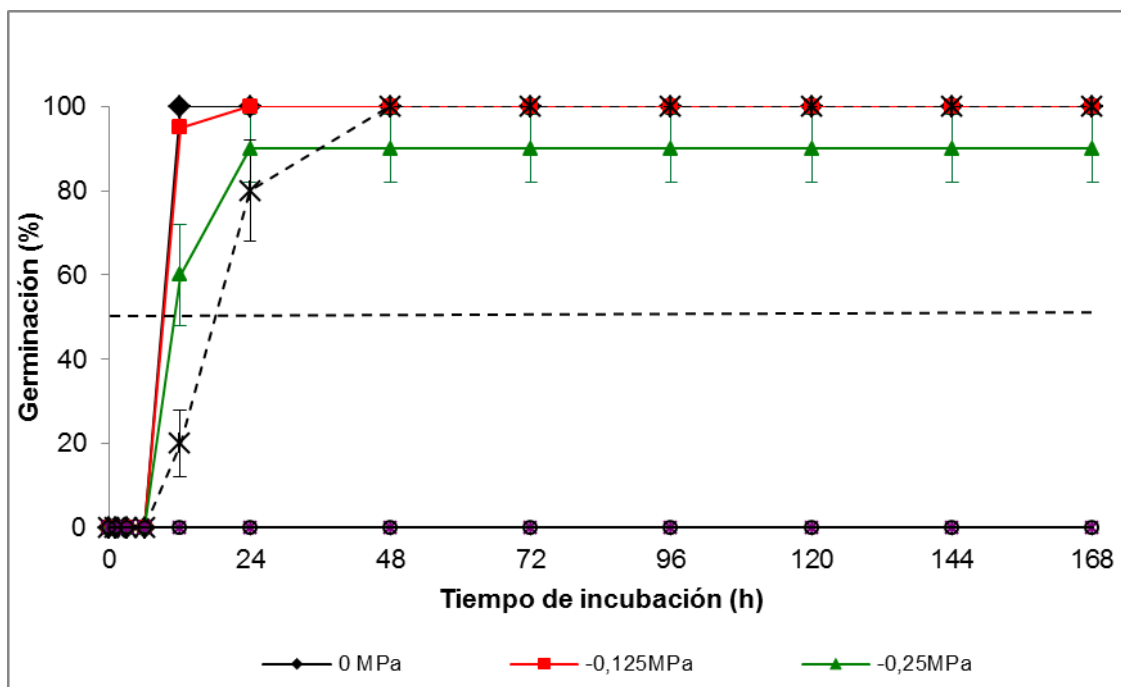


Figura 9. Germinación (%) de ejes embrionales aislados de semillas de soja maduras y secas incubados en agua destilada (control, $\Psi_a = 0$ MPa) o soluciones de Polietilenglicol 8000 (PEG) de diferentes Ψ_a (-0,125; -0,25; -0,5; -1 y -1,5 MPa) durante 168 h a 27 ± 1 °C y oscuridad. La línea de puntos corresponde al 50 %G. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 ejes embrionales cada una.

En el inserto de la Figura 10 se muestran las primeras 24 h de imbibición para la incubación en las diferentes soluciones. La Fase II se inició a las 2 h de incubación para las soluciones de 0; -0,125; -0,25 y -0,5 MPa, con una ganancia promedio de 6,99; 6,34; 5,81 y 5,51 μl de H_2O por eje embrional, respectivamente. En tanto, para -1 y -1,5 MPa, la Fase II se alcanzó a las 3 h con una ganancia promedio de 5,58 y 4,98 μl de H_2O por eje embrional, respectivamente (Fig. 10). El inicio de la Fase III se visualizó a partir de las 6 h en el control (0 MPa), a partir de las 9 h para las soluciones de -0,125; -0,25 y -0,5 MPa, y no ocurrió para las soluciones de -1 y -1,5 MPa (Fig. 10).

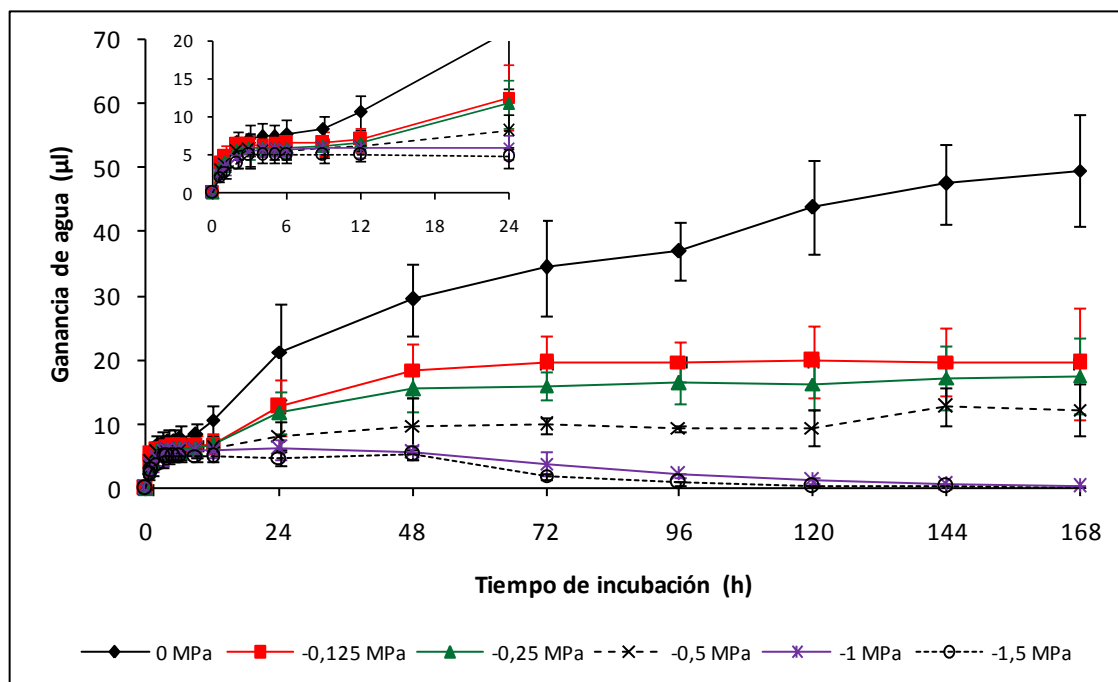


Figura 10. Ganancia de agua (μl) de ejes embrionales aislados de semillas de soja maduras y secas incubados en agua destilada (control, $\Psi_a = 0$ MPa) o soluciones de Polietilenglicol 8000 (PEG) de diferentes Ψ_a (-0,125; -0,25; -0,5; -1 y -1,5 MPa) durante 168 h a 27 ± 1 °C y oscuridad. En el inserto se muestran las primeras 24 h de incubación. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 ejes embrionales cada una.

El efecto de la restricción hídrica sobre la expansión celular y, consecuentemente, sobre la germinación de los ejes embrionales quedó claramente demostrado a partir del análisis de ejes incubados durante 24 h en solución de PEG de $\Psi_a = -1$ MPa y luego transferidos a agua destilada ($\Psi_a = 0$ MPa), continuando la incubación en este medio otras 24 h (Fig. 11).

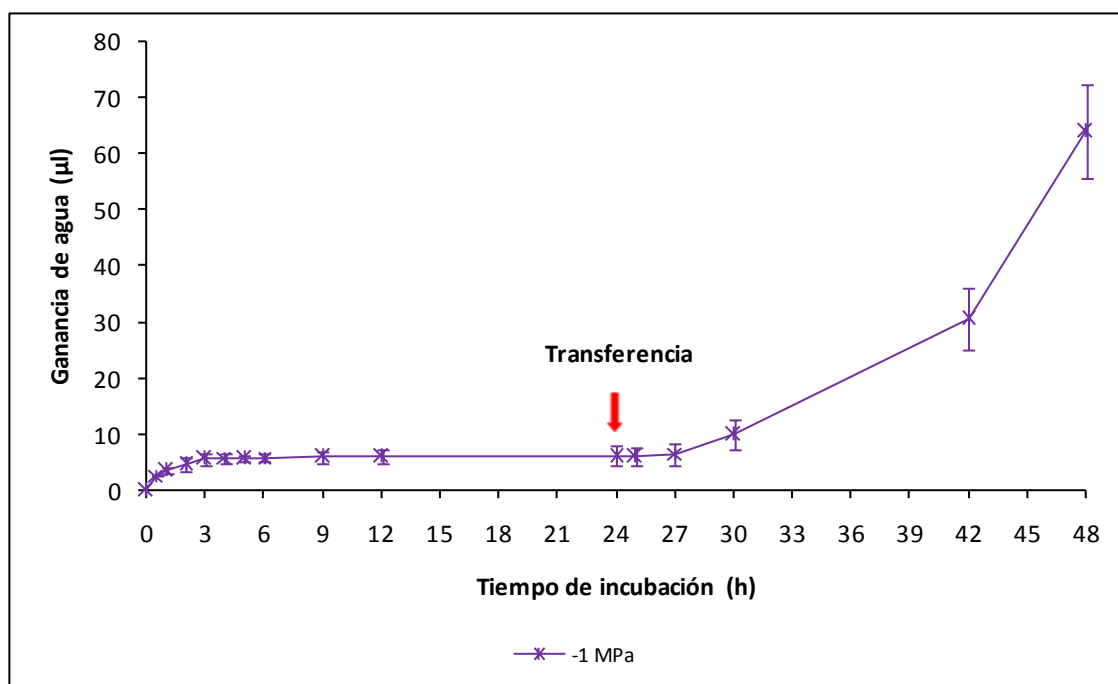


Figura 11. Ganancia de agua (μl) de ejes embrionales aislados de semillas de soja maduras y secas incubados en solución de Polietilenglicol 8000 (PEG) de $\Psi_a = -1$ MPa durante 24 h y luego transferidos e incubados en agua destilada ($\Psi_a = 0$ MPa, flecha roja) durante 24 h más. Las incubaciones se realizaron a 27 ± 1 °C y oscuridad. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 ejes embrionales cada una.

De igual manera que en la situación previamente descrita, los ejes en $\Psi_a = -1$ MPa presentaron una fase I de ganancia de agua rápida, iniciando la fase II alrededor de la tercer hora de incubación y manteniéndose en dicha fase durante las restantes 21 h y aún luego de 3 h de ser transferidos a agua destilada. A partir de ese momento se reanudó la ganancia de agua de un modo sostenido, visualizándose la elongación de los ejes a partir de las 36 h de incubación totales.

Restricción hormonal: Incubación de ejes embrionales de soja en soluciones de diferente concentración de Ácido Abscísico (ABA).

Para los ejes incubados en soluciones de 0 (control); 6,25 y 12,5 μM de ABA, la germinación se inició a las 6, 12 y 24 h de incubación (Fig. 12), coincidentemente con el tiempo de inicio de la Fase III de imbibición (inserto Fig. 13). Para las soluciones de 25, 50 y 100 μM de ABA no se registró germinación, permaneciendo los ejes incubados en fase II durante el tiempo que duró el experimento (Fig. 12). La fase I de imbibición en todos los casos describió una dinámica similar, alcanzando la fase II simultáneamente a las 2 h de incubación, con una ganancia promedio de 6,4 μl de H_2O por eje embrional (Fig. 13). Los %G máximos fueron, 100 % para el control a partir de las 12 h, 60 % para 6,25 μM de ABA a las 48 h y 20 % para 12,5 μM de ABA a las 96 h de incubación (Fig. 12). El t_{50} fue 9 h y 40 h para 0 y 6,25 μM de ABA, respectivamente (Fig. 12).

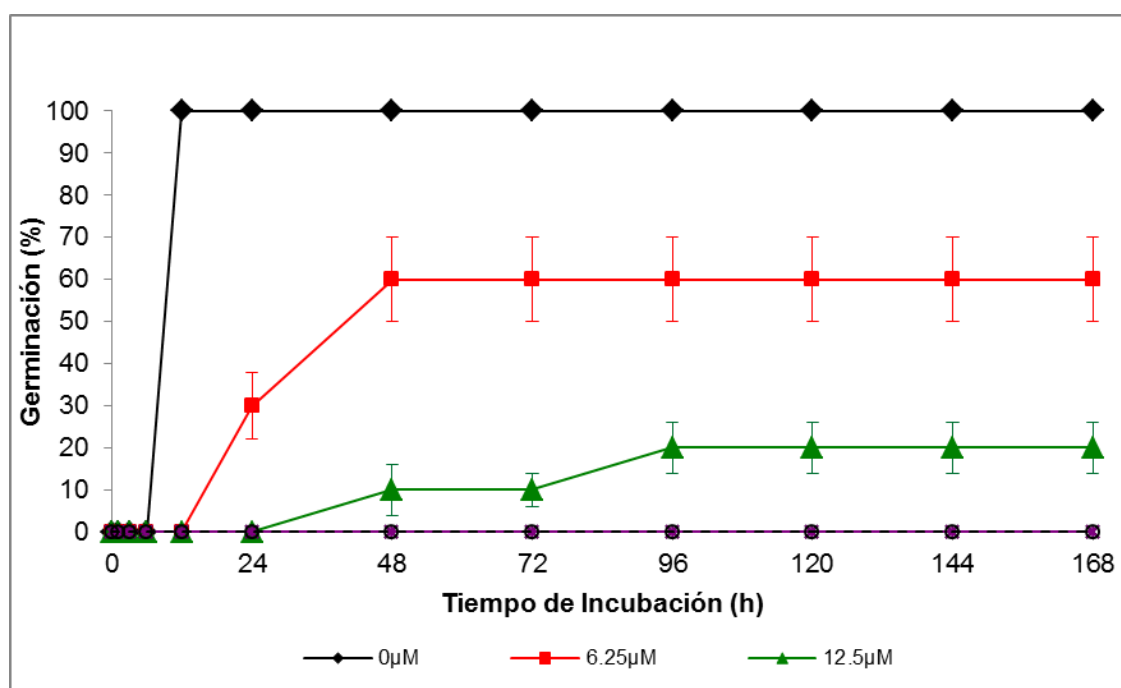


Figura 12. Germinación (%) de ejes embrionales aislados de semillas soja maduras y secas incubados en agua destilada ([ABA]= 0 μM) o soluciones de ABA de diferentes concentraciones ([ABA]= 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 μM) durante 168 h a 27 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ y oscuridad. La línea de puntos corresponde al 50 %G. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 ejes embrionales cada una.

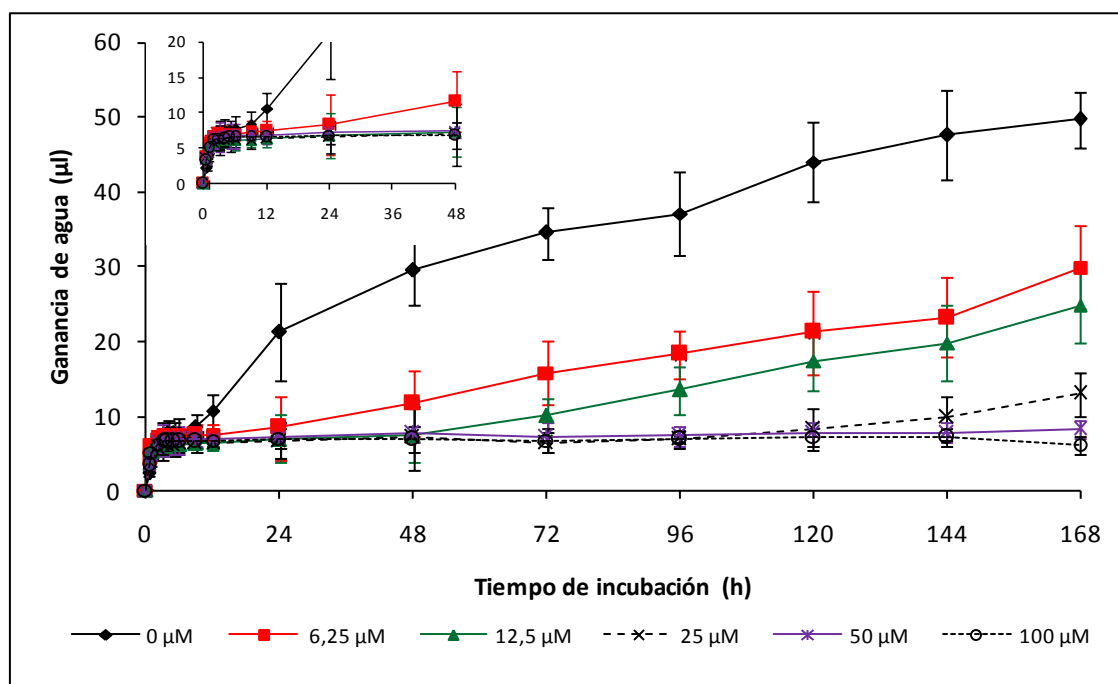


Figura 13. Ganancia de agua (μl) de ejes embrionales aislados de semillas de soja maduras y secas incubados en agua destilada ($[\text{ABA}] = 0 \mu\text{M}$) o soluciones de ABA de diferentes concentraciones ($[\text{ABA}] = 6,25; 12,5; 25; 50$ y $100 \mu\text{M}$) durante 168 h a $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y oscuridad. En el inserto se muestran las primeras 48 h de incubación. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 ejes embrionales cada una.

Similarmente a lo ocurrido en soluciones de Ψ_a decrecientes, la restricción en la ganancia de agua como consecuencia del efecto inhibitorio de una solución $50 \mu\text{M}$ de ABA durante 24 h de incubación fue superada luego de la transferencia de los ejes embrionales a un medio de incubación en agua destilada. En esta ocasión, los ejes que se encontraban en fase II desde la segunda hora de incubación en ABA permanecieron en dicha fase hasta 12 h después de la transferencia a agua (36 h de incubación totales), a partir de lo cual iniciaron una fase III de ganancia sostenida de agua, evidenciándose la expansión de los ejes a las 48 h (Fig. 14).

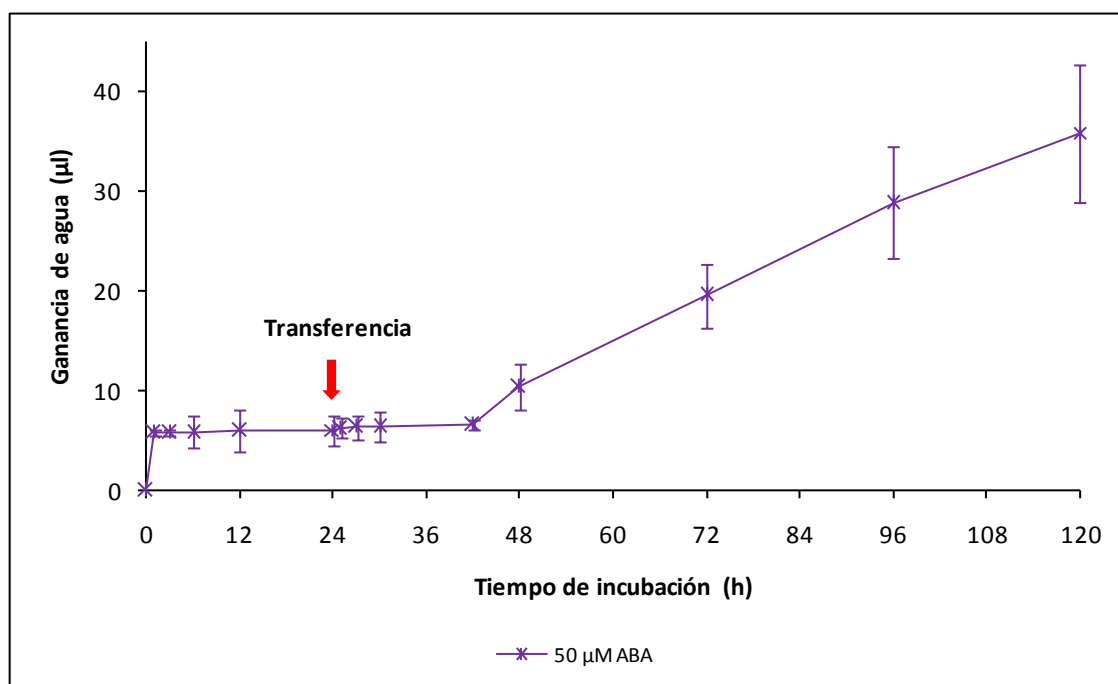


Figura 14. Ganancia de agua (μl) de ejes embrionales aislados de semillas de soja maduras y secas incubados en solución de ABA $50 \mu\text{M}$ durante 24 h y luego transferidos e incubados en agua destilada ($[\text{ABA}] = 0 \mu\text{M}$, flecha roja) durante 96 h más. Las incubaciones se realizaron a $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y oscuridad. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 ejes embrionales cada una.

Temporalidad de la acción del ABA: Incubación de ejes embrionales aislados sometidos a transferencias recíprocas Agua - ABA.

Los resultados obtenidos para la incubación en PEG o ABA seguidos de la transferencia y posterior incubación en agua mostraron que, si bien es posible en ambos casos reanudar la absorción hídrica y concretar la germinación de los ejes embrionales luego de la transferencia, el proceso se inició más tarde y ocurrió más lentamente para la condición en ABA. A fin de definir y/o acotar la ventana temporal sobre la cual el efecto inhibitorio del ABA es aún posible, se planteó el estudio de transferencias recíprocas para ejes embrionales preincubados por diferentes tiempos en agua o ABA al medio de incubación contrario (ABA o agua). En la Figura 15 se observa la evolución de la germinación para ejes embrionales de soja en $50 \mu\text{M}$ de ABA (medio de incubación final) luego de diferentes horas de incubación previa en agua destilada (medio de incubación inicial). El tiempo que identifica a cada curva en la figura corresponde a las horas de incubación previas en agua destilada. Los %G iniciales ($t = 0$) corresponden al valor registrado para las distintas muestras en agua al momento de la transferencia a la solución de ABA. Para las

curvas correspondientes a las incubaciones entre 1 y 5 h en agua (curvas 1h - 5h), los ejes no presentaron germinación inicial y resultaron por lo tanto inhibidos luego de la transferencia e incubación en ABA, de igual manera que los correspondientes al control de incubación en ABA (curva 0h). Para 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 h de incubación en agua, los %G al momento de la transferencia fueron: 10, 30, 40, 70, 60, 90 y 100%, respectivamente. Luego de la transferencia, se alcanzó un máximo de germinación en ABA de 30 % y 80 %, para 6 y 7 h, respectivamente, en tanto se registró el 100 %G para 8 a 12 h (Fig. 15). Claramente, los ejes preincubados 6 h en agua no alcanzaron el 50 %G luego de ser transferidos, aquellos que permanecieron 7 h en agua alcanzaron el 50 %G más lentamente que los preincubados 8 h; en tanto los preincubados por más de 8 h en agua ya habían superado el 50 %G al momento de la transferencia (Fig. 15).

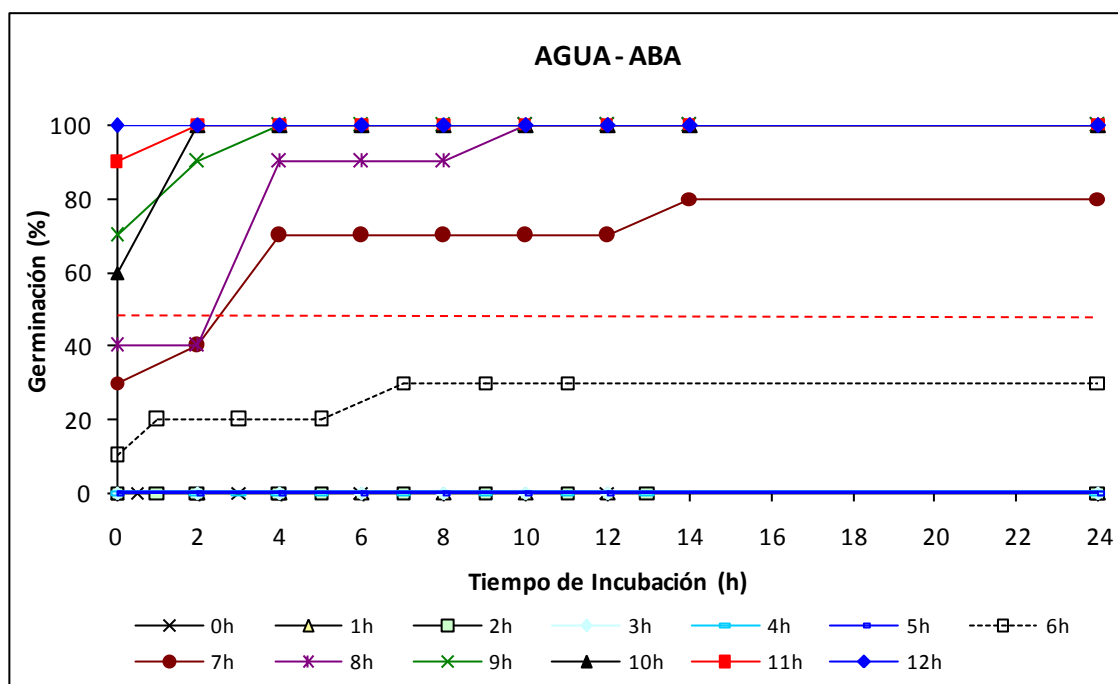


Figura 15. Germinación (%) de ejes embrionales de semillas de soja maduras y secas en solución 50 μ M de ABA durante 24 h (medio de incubación final) que fueron previamente incubados por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas en agua destilada (medio de incubación inicial). Los %G iniciales ($t = 0$) corresponden a los valores observados al momento de las respectivas transferencias desde el medio de incubación inicial (agua) al final (ABA). La línea de puntos corresponde al 50 %G. Las incubaciones se realizaron a 27 ± 1 °C y oscuridad. Los puntos representan el promedio de 25 ejes embrionales para cada condición.

Para este mismo experimento, se evaluó también la evolución de la ganancia de agua durante 24 h para los ejes embrionales a partir del momento de la transferencia a ABA (Fig. 16). La identificación para cada curva (0 a 6h Fig. 16 A; 7 a 12h Fig. 16 B) indicó nuevamente las horas de incubación previas en agua (valores de tiempo negativos en el eje de abscisas), en tanto la ganancia de agua inicial ($t = 0$) correspondió a la registrada al momento de la transferencia a ABA. En la Figura 16 A, los ejes correspondientes a la curva 0h (control de incubación en ABA) experimentaron un aumento importante en la ganancia de agua (6,4 μ l) durante las dos primeras horas (Fase I), permaneciendo luego en Fase II hasta finalizar el experimento. Resultados similares se obtuvieron para los restantes tratamientos mostrados en la figura, independientemente de la cantidad de horas (1 a 6) de incubación previa en agua, manteniendo estable el volumen de agua absorbida (7 μ l) durante toda la incubación en ABA (Fase II), sin experimentar una posterior ganancia de agua (Fig. 16 A). Estos resultados indicarían que el efecto inhibitorio de la germinación por ABA fue aún posible con hasta 6 h de imbibición previa en agua, tal como confirman la ausencia de fase III (Fig. 16 A) y los %G nulos (o mínimo en 6 h) para los respectivos casos (Fig. 15). Por el contrario, los ejes incubados en agua por 7 y hasta 12 h (Fig. 16 B) presentaron un aumento de volumen sostenido, aún luego de la transferencia a ABA, con ganancias de agua inicial (Fig. 16 B, $t = 0$) y final mayores cuanto mayor fue el tiempo de permanencia en el medio inicial. Claramente, la incubación previa por 7 o más horas en agua destilada fueron suficientes para permitir iniciar y completar la germinación de los ejes embrionales aún luego de la transferencia e incubación en presencia de concentraciones inhibitorias de ABA (Fig. 15).

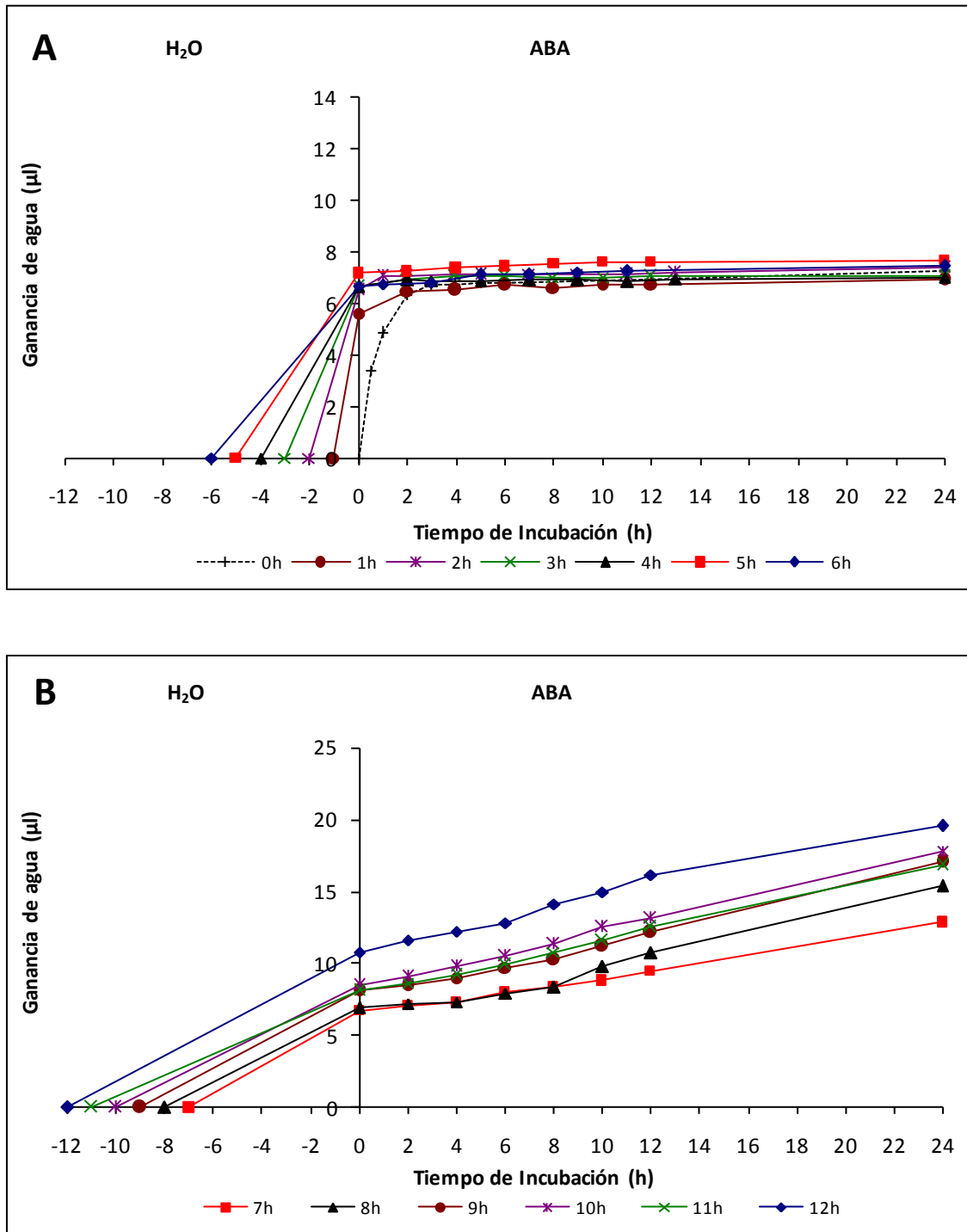


Figura 16. Ganancia de agua (μl) de ejes embrionales aislados de semillas de soja maduras y secas en solución $50 \mu\text{M}$ de ABA durante 24 h (medio de incubación final) que fueron incubados por 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas (A) y 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas (B) en agua destilada (medio de incubación inicial). Las ganancias de agua iniciales ($t = 0$) corresponden a los valores observados al momento de las respectivas transferencias desde el medio de incubación inicial (agua) al final (ABA). Las incubaciones se realizaron a $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y oscuridad. Los puntos representan el promedio de 25 ejes embrionales para cada condición.

Para el caso de la transferencia recíproca (ABA – agua), la Figura 17 muestra el %G durante 24 h de incubación en agua destilada (medio de incubación final) para ejes embrionales incubados previamente en 50 μM de ABA (medio de incubación inicial) por diferentes tiempos. Nuevamente, el tiempo que identifica a cada curva en la figura corresponde a las horas de incubación previas, esta vez, en ABA. A diferencia de la situación anterior, dadas las condiciones inhibitorias de la germinación para la solución 50 μM de ABA, se observaron nullos %G iniciales (previo a la transferencia) para todos los tiempos de incubación (Fig. 17, $t = 0$). Adicionalmente, también para todos los tiempos de incubación, los ejes germinaron normalmente luego de la transferencia a agua destilada, alcanzando el 100 %G (Fig. 17).

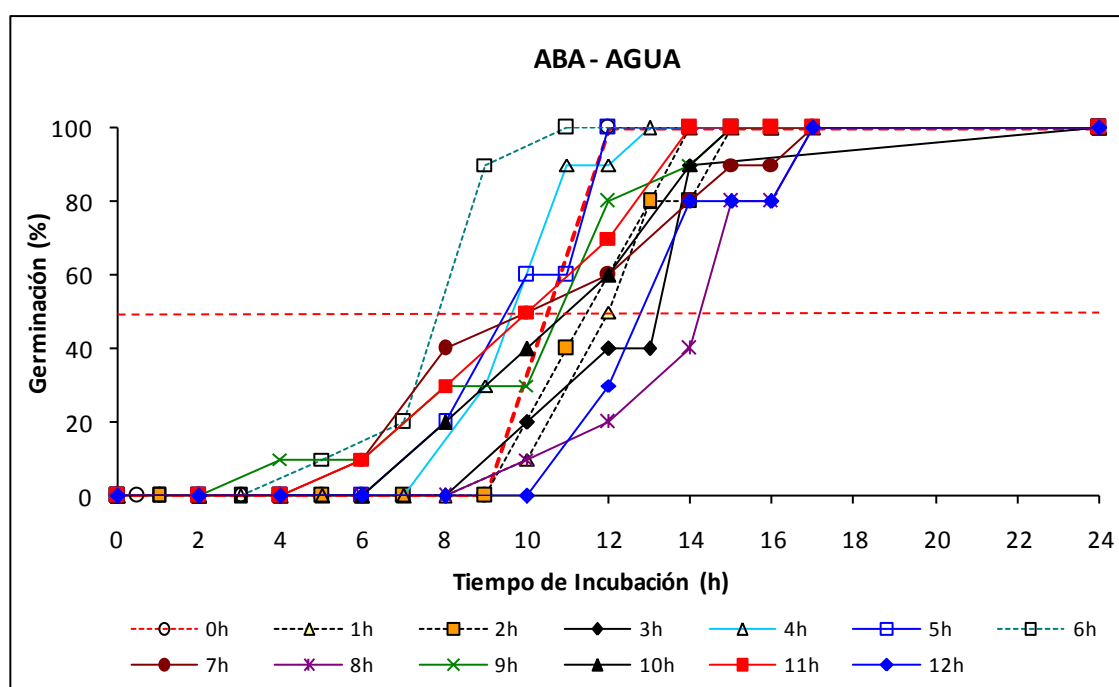


Figura 17. Germinación (%) de ejes embrionales de semillas de soja maduras y secas en agua destilada durante 24 h (medio de incubación final) que fueron previamente incubados por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas en una solución 50 μM de ABA (medio de incubación inicial). Los %G iniciales ($t = 0$) corresponden a los valores observados al momento de las respectivas transferencias desde el medio de incubación inicial (ABA) al final (agua). La línea de puntos corresponde al 50 %G. Las incubaciones se realizaron a 27 ± 1 °C y oscuridad. Los puntos representan el promedio de 25 ejes embrionales para cada condición.

Tanto para los ejes embrionales correspondientes a la curva 0h (control de incubación en agua) como para aquellos incubados en 50 μM de ABA se encontró que, independientemente de la cantidad de horas de incubación en condiciones inhibitorias para la germinación (1 a 12 h), la ganancia de agua en la fase II (~ 6 μl) fue similar en todos los casos (Fig. 18). Estos resultados indicaron que la presencia de ABA en el medio no afectó las fases I y II de imbibición. Adicionalmente, también

en todos los casos y durante la incubación en agua, se registró el inicio de la fase III (Fig. 18), indicando que el efecto inhibitorio fue sólo posible en tanto el ABA estuvo presente en el medio de incubación.

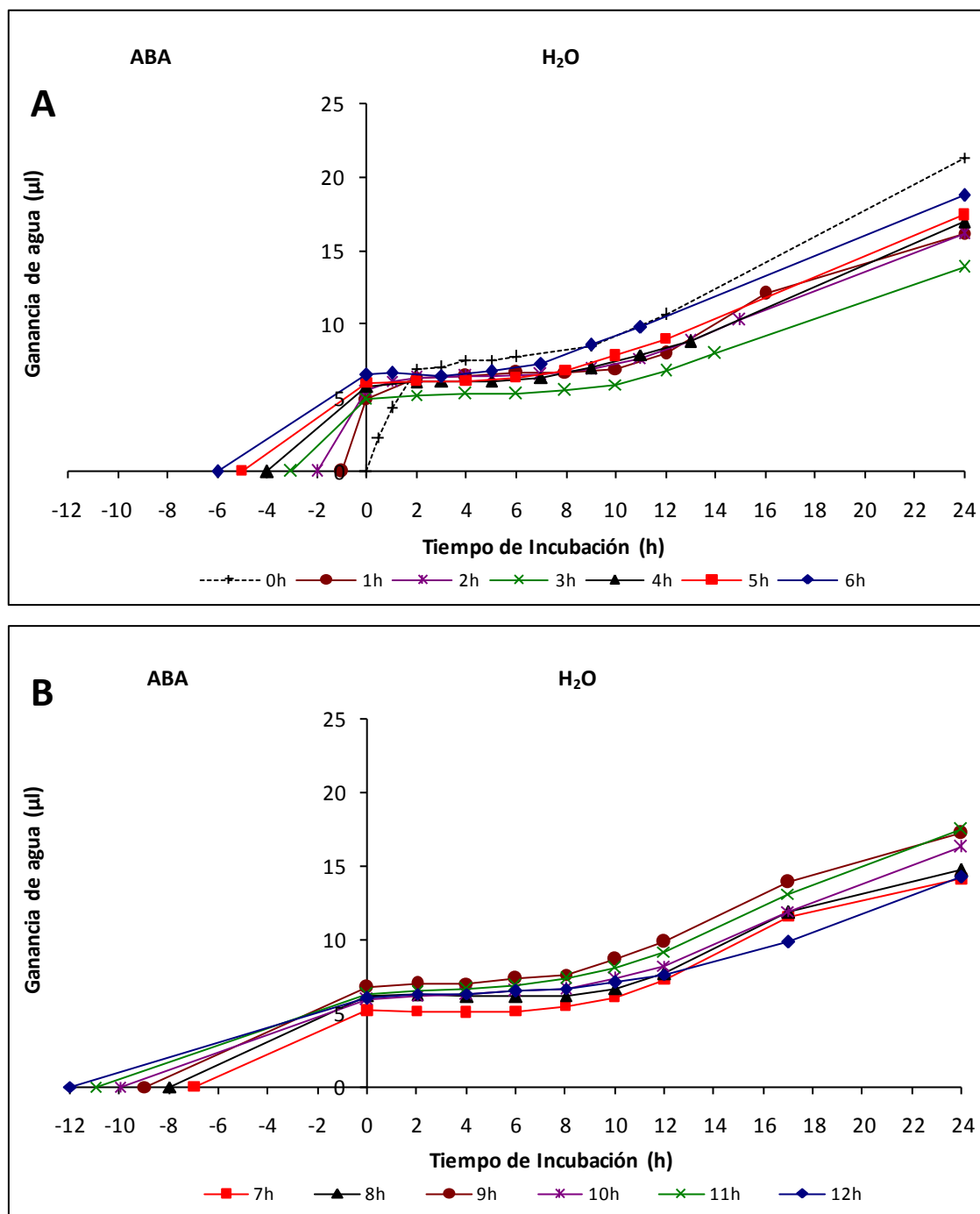


Figura 18. Ganancia de agua (µl) de ejes embrionales aislados de semillas de soja maduras y secas en agua destilada durante 24 h (medio de incubación final) que fueron incubados por 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas (A) y 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas (B) en solución 50 µM de ABA (medio de incubación inicial). Las ganancias de agua iniciales (t = 0) corresponden a los valores observados al momento de las respectivas transferencias desde el medio de incubación inicial (ABA) al final (agua). Las incubaciones se realizaron a 27 ± 1 °C y oscuridad. Los puntos representan el promedio de 25 ejes embrionales para cada condición.

Identificación de la zona de elongación durante la germinación.

Los antecedentes indican que la expansión celular responsable de la protrusión radicular y que define, por lo tanto, la germinación, está confinada a una región particular del eje embrional conocida como “zona de elongación” (ZE). En la Figura 19 se muestra un eje embrional de una semilla madura y seca a tiempo 0 h (Fig. 19 A) y luego de 12 h de incubación en agua destilada (Fig. 19 B). Previo a la incubación, la cara abaxial del eje fue marcada longitudinalmente con tinta indeleble, generando marcas equidistantes. Luego de la incubación, se evidenció un cambio de forma y distanciamiento asimétricos en y entre las marcas. Desde el extremo plumular, la distancia sucesiva entre la primera, segunda y tercer marca resultó prácticamente inalterada, en tanto se registró una mayor separación entre la tercera, cuarta y quinta marca, de mayor magnitud entre las primeras. Esta región del hipocótilo, comprendida desde aproximadamente 2 mm por debajo del extremo plumular e inmediatamente por encima de la radícula fue la responsable directa del alargamiento celular que condujo a la germinación y define, por lo tanto, la ZE del eje embrional de soja.

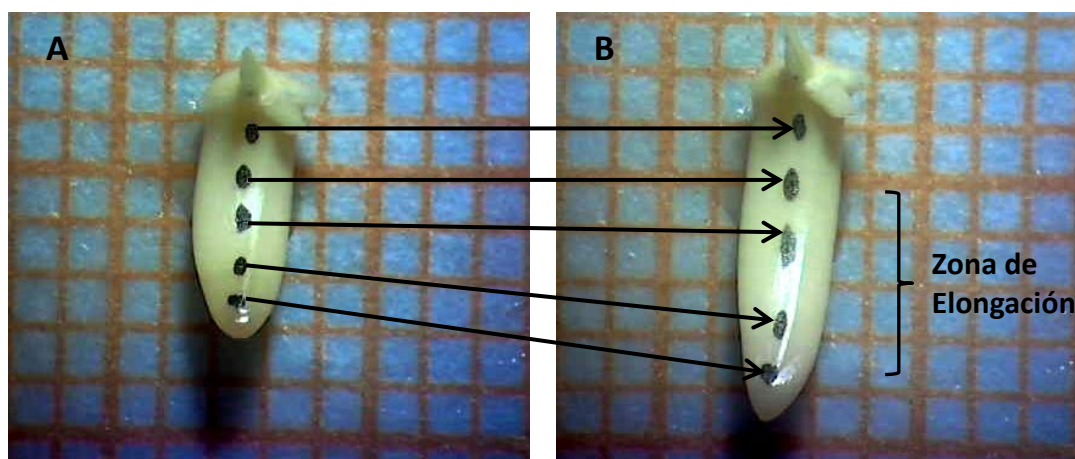


Figura 19. Eje embrional de semilla de soja madura y seca marcado con tinta indeleble, previo (0 h, A) y luego de la incubación (12 h, B) en agua destilada a 27 ± 1 °C y oscuridad. Las imágenes representan una muestra de 10 ejes embrionales evaluados a cada tiempo.

Por su parte, los análisis de imágenes radiográficas de los ejes embrionales germinados (Fig. 20) permitieron visualizar la ZE como aquella donde preferencialmente ocurrió la expansión celular durante la germinación. El color amarillo en la imagen (Fig. 20 B) determinó la presencia de agua, en tanto el patrón de distribución de la coloración se correspondió con la densidad de distribución de

agua en la estructura. De este modo, se pudo apreciar la localización de agua principalmente concentrada en la ZE del eje embrional, dando una clara evidencia de la naturaleza expansiva de la germinación conducida por cambios de turgencia celular.

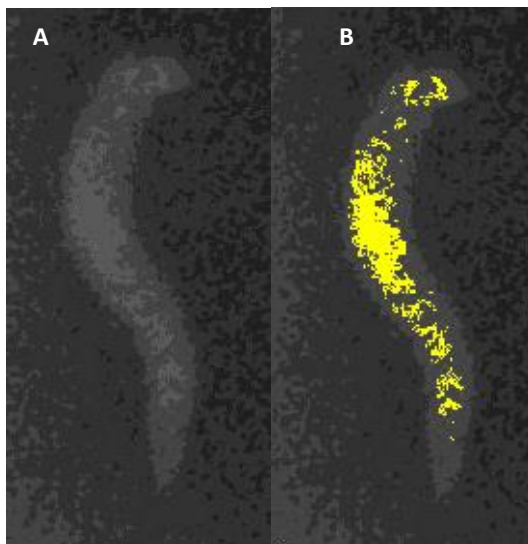


Figura 20. A) Imagen radiográfica de un eje embrional aislado de una semilla de soja madura y seca luego de 18 h de incubación en agua destilada. B) Zonas de densidad semejante (color amarillo) indicando el patrón de distribución de agua en el eje embrional. Las imágenes representan una muestra de 10 ejes embrionales evaluados a cada tiempo.

Análisis del alargamiento celular.

a- Observaciones *in vitro*.

Microscopía óptica.

En la Figura 21 se observan los cortes histológicos correspondientes a la ZE de un eje embrional aislado de semillas de soja de 45 DDA (MF) al momento de la cosecha (A) y de otro luego de 24 h de incubación en agua destilada (B). Las barras blancas de medición en la figura permiten comparar los cambios de tamaño celular para las células corticales. Cabe aclarar que, dada la naturaleza destructiva de la técnica, los cortes histológicos mostrados en ambas figuras no correspondieron al mismo eje embrional. Sin embargo, se constató que, durante la incubación, las células comprendidas en la ZE resultaron notoriamente expandidas y que la expansión celular ocurrió preferentemente en sentido longitudinal, con una variación promedio de dos veces la longitud inicial.

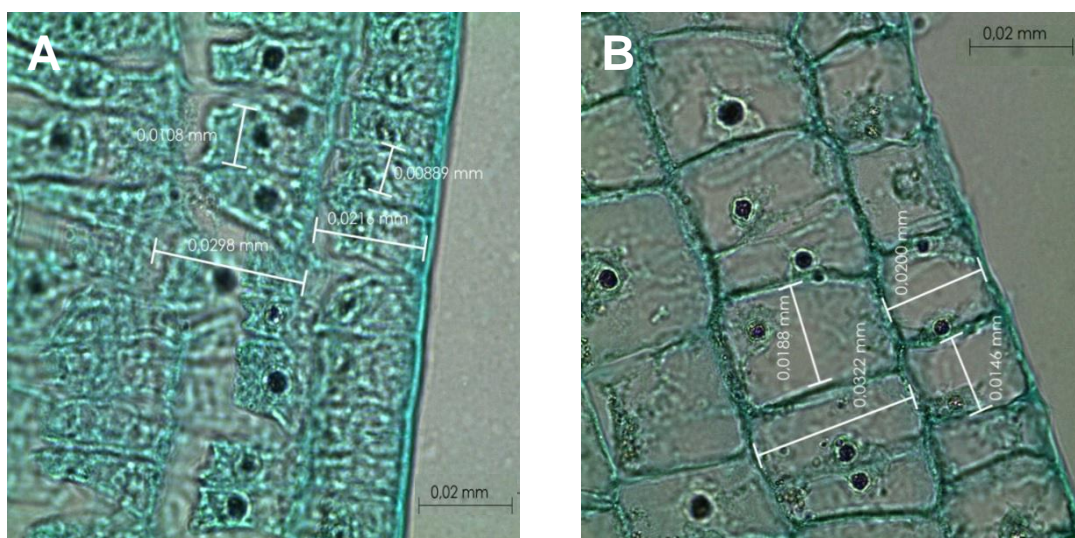


Figura 21. Zona de elongación de ejes embrionales de semillas de soja de 45 días después de antesis (MF): (A) sin incubación y (B) luego de 24 h de incubación en agua destilada a 27 ± 1 °C. (Aumento 100x). Las imágenes representan una muestra de 10 ejes embrionales evaluados a cada tiempo.

b- Observaciones *in vivo*.

Microscopía confocal.

Las tecnologías *in vivo* admiten las observaciones microscópicas de un modo no destructivo, permitiendo evaluar la evolución del crecimiento celular sobre la misma muestra durante el proceso germinativo y confirmar las observaciones obtenidas por microscopía óptica.

La longitud y sección transversal promedio de un eje embrional de soja en madurez fisiológica, al momento de la cosecha fueron, ~ 4 y 1 mm, respectivamente (Fig. 22). Estas dimensiones para el mismo eje al cabo de 12 h de incubación en condiciones de germinación resultaron de ~ 7 y 1 mm (Fig. 23), ratificando el sentido longitudinal del crecimiento expansivo en este proceso.

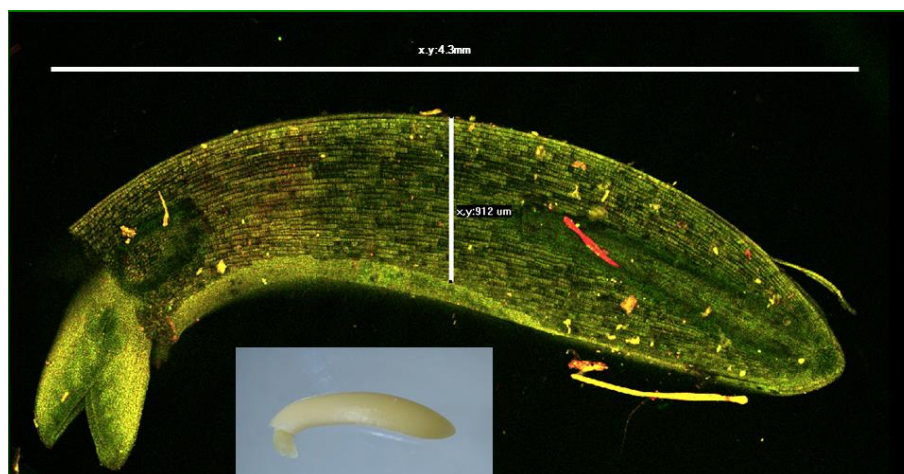


Figura 22. Imagen por microscopía confocal de un eje embrional aislado de semilla de soja de 45 días después de antesis (MF), sin incubación (aumento 4X). En el recuadro inferior se muestra una fotografía digital del mismo eje embrional. Las imágenes representan una muestra de 20 ejes embrionales evaluados a cada tiempo.

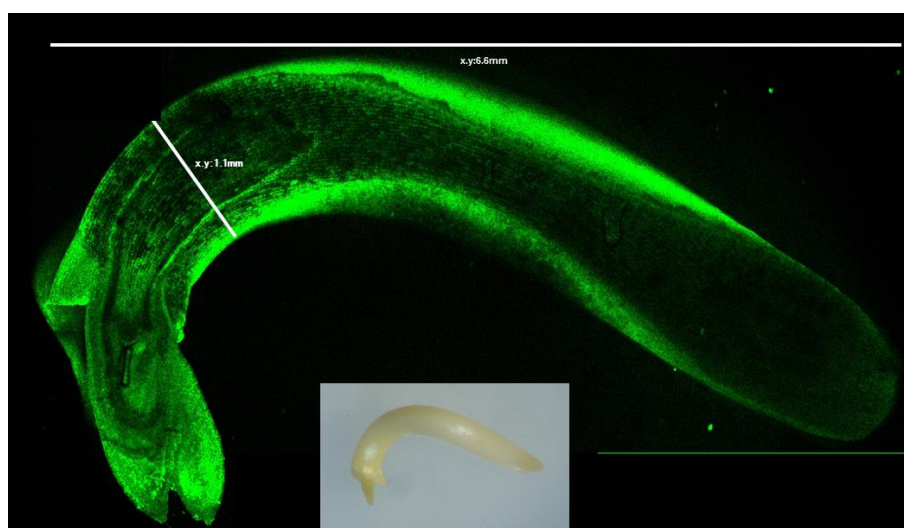


Figura 23. Imagen por microscopía confocal de un eje embrional aislado de semilla de soja de 45 días después de antesis (MF), luego de 12 h de incubación en agua destilada (aumento 4X). En el recuadro inferior se muestra una fotografía digital del mismo eje embrional. Las imágenes representan una muestra de 20 ejes embrionales evaluados a cada tiempo.

Las Figuras 24.y 25 muestran a una aproximación (aumento 100X) para la ZE del eje embrional en las condiciones previamente descriptas. Las mediciones en ambos casos indicaron un cambio de longitud promedio para las células corticales de ~ 10 a ~ 30 μm .

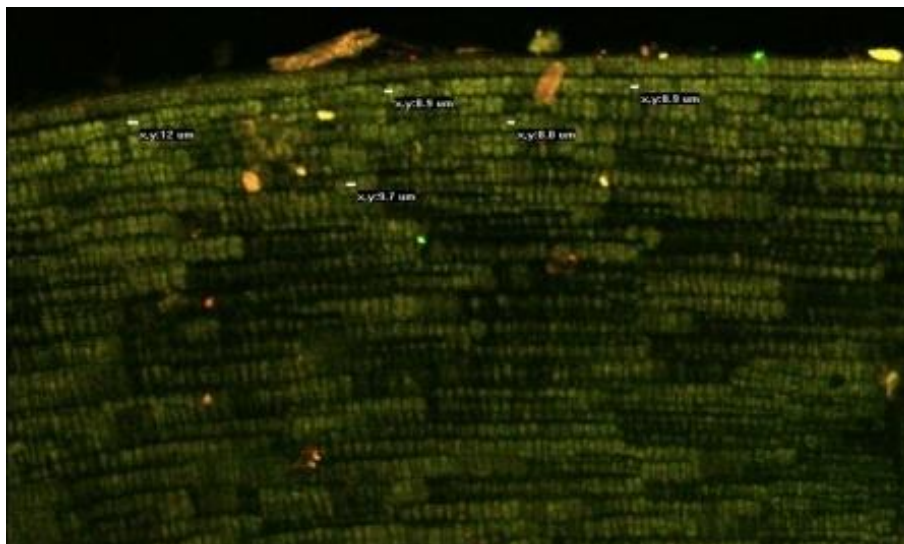


Figura 24. Imagen por microscopía confocal de la zona de elongación de un eje embrional aislado de semilla de soja de 45 días después de antesis (MF), sin incubación (aumento 100X). La longitud celular en dicha zona estuvo en un rango de 8-12 μm . Las imágenes representan una muestra de 20 ejes embrionales evaluados a cada tiempo.

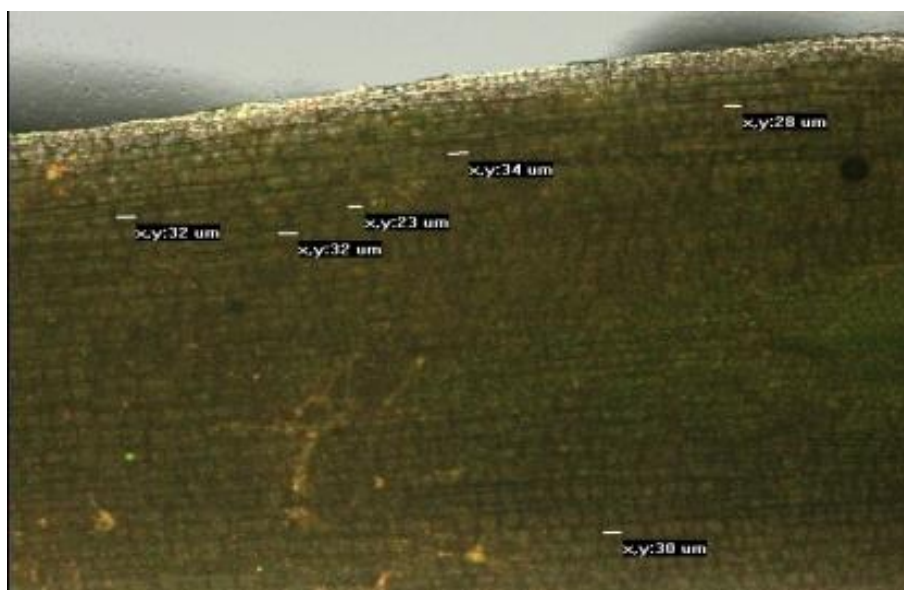


Figura 25. Imagen por microscopía confocal de la zona de elongación de un eje embrional aislado de semilla de soja de 45 días después de antesis (MF), luego de 12 h de incubación en agua destilada (aumento 100X). La longitud celular en dicha zona estuvo en un rango de 25-35 μm . Las imágenes representan una muestra de 20 ejes embrionales evaluados a cada tiempo.

Microscopía electrónica de barrido ambiental.

Las observaciones realizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido en función ambiental confirmaron con mayor detalle y resolución los resultados informados precedentemente, estableciendo en este caso una duplicación promedio en longitud para las células corticales de la ZE de ejes embrionales de semillas de soja en madurez fisiológica luego de 10 h de incubación (Fig. 26).

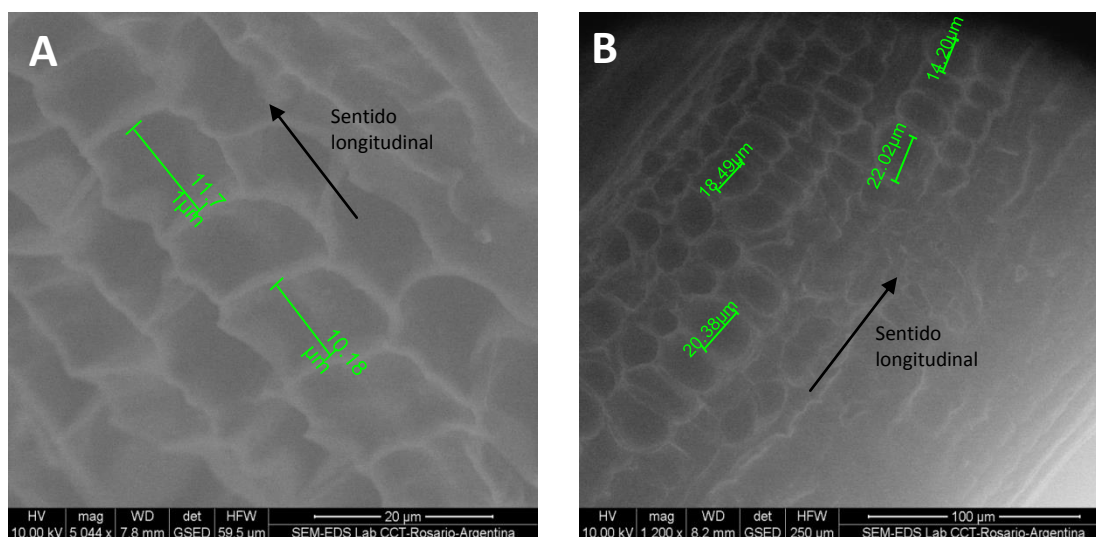


Figura 26. Imagen por microscopía electrónica ESEM de la zona de elongación de un eje embrional aislado de semilla de soja de 45 días después de antesis (MF) sin incubación (A, 5044X) y luego de 10 h de incubación en agua destilada (B, 1200X) La longitud de las células en dicha zona aumentó, aproximadamente, dos veces el tamaño inicial luego de la germinación de los ejes. Las imágenes representan una muestra de 5 ejes embrionales evaluados a cada tiempo.

Expansión celular durante la germinación de semillas de soja: Aspectos moleculares.

Se ha postulado a las Expansinas como proteínas implicadas en todos los procesos vegetales que involucran debilitamiento de paredes celulares, operando como iniciadoras y por lo tanto responsables de los eventos primarios que dan lugar a la germinación de semillas. Estas proteínas presentan actividad óptima a pH ácido. En la Figura 27 los ejes embrionales incubados en agua (control) presentaron el patrón de comportamiento trifásico característico del proceso de germinación, con una Fase I rápida (~ 2 h y 5,5 μ l de ganancia de agua), una Fase II estable hasta iniciar la Fase III (germinación en sentido estricto) alrededor de la octava hora de incubación. En tanto, los ejes incubados en buffer pH8 (condición subóptima para la actividad Expansina) presentaron una dinámica similar al control en las Fase I y II,

manteniéndose estables y sin germinar hasta el final del tratamiento (Fig. 27). Estos mismos ejes, una vez transferidos a agua destilada (Fig. 27, flecha verde) reanudaron el proceso expansivo e iniciaron la germinación luego de 11 h de incubación en este último medio (35 h de incubación totales). Estos resultados constituyeron una evidencia indirecta del crecimiento ácido al cual se hace referencia en cuanto a la participación de proteínas Expansinas durante la germinación.

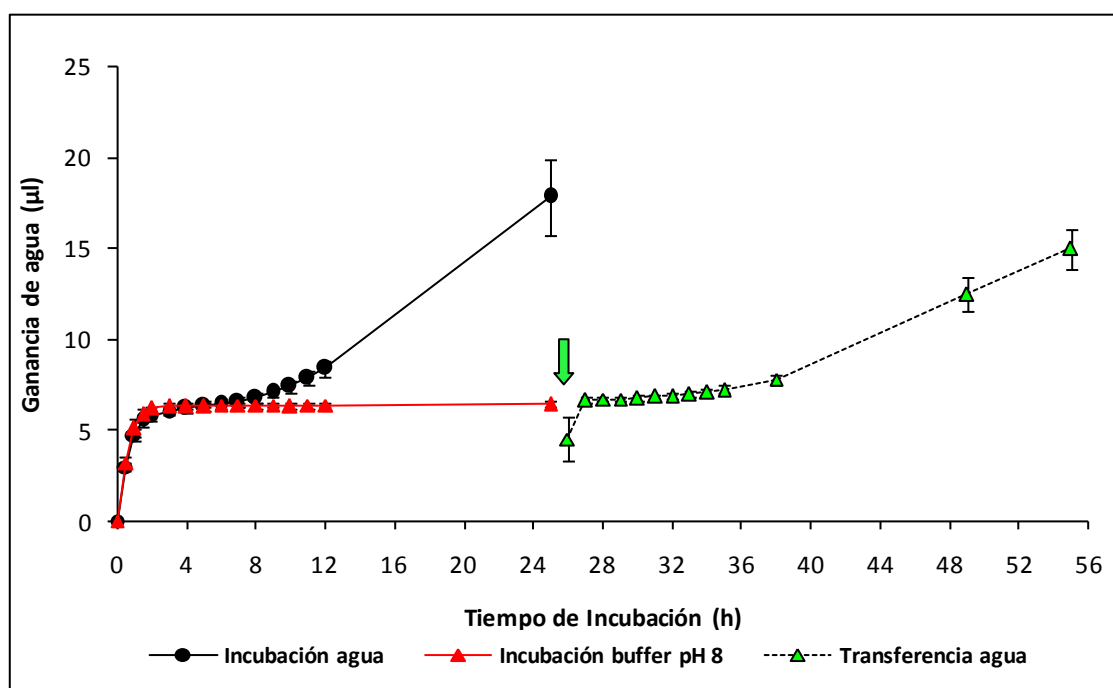


Figura 27. Ganancia de agua (μl) de ejes embrionales aislados de semillas de soja maduras y secas incubados en agua destilada (control) o en buffer pH8 durante 24 h y luego transferidos e incubados en agua destilada (flecha verde) durante 32 h más. Las incubaciones se realizaron a 27 ± 1 °C y oscuridad. Los puntos representan el promedio \pm DE para dos réplicas de 10 estructuras cada una.

Análisis Bioinformático de secuencias Expansinas para el diseño de cebadores para PCR.

Gimeno-Gilles *et al.* (2009) informaron que el ABA inhibe la germinación de semillas de *Medicago truncatula* evitando el debilitamiento de la pared celular y demostraron que actúa reprimiendo la expresión de varias enzimas y proteínas involucradas en este proceso, entre las cuales se encontró una Expansina (TC96054). A partir de la secuencia EST (expressed sequence tag, ES466859) publicada en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para esta Expansina, se realizó una búsqueda por homología de secuencia para la

especie en estudio (*Glycine max*) y otras especies de angiospermas. Se identificaron también, otras secuencias con dominio y/o función Expansina en bases de datos del NCBI para *Glycine max*. A partir de todas estas secuencias, se construyó un árbol filogenético de proteínas (Fig. 28) con la finalidad de reducir el número de secuencias a aquellas para las cuales se presentó mayor homología con la presente en *M. truncatula*.

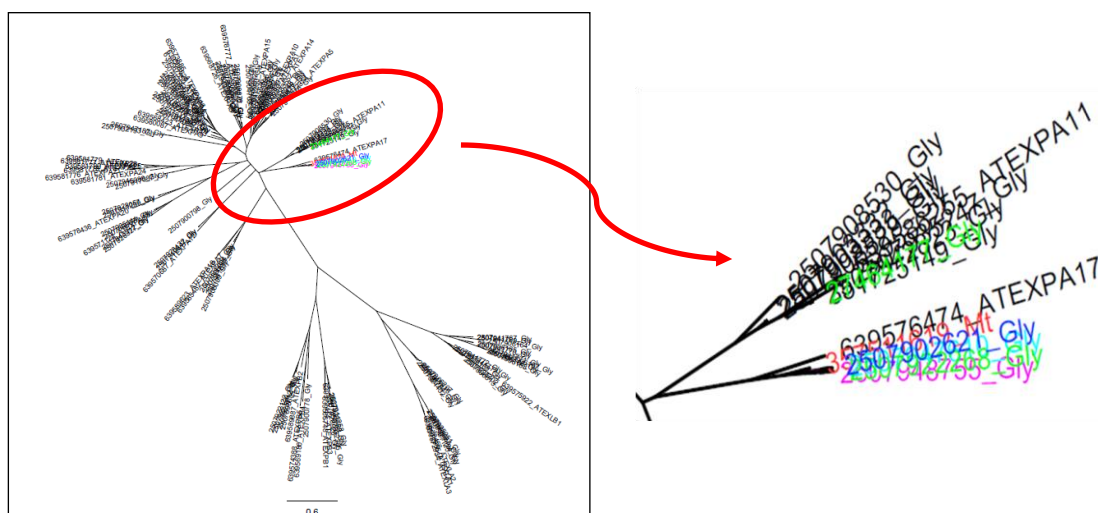


Figura 28. Árbol Filogenético de secuencias de proteínas con función Expansina de *Glycine max* (Gly), *Medicago truncatula* (Mt) y *Arabidopsis thaliana* (AT). En la imagen de la derecha se indican, en color, cuatro proteínas de Gly con mayor homología de secuencia a la Expansina sensible a ABA involucrada en la germinación de semillas de Mt (indicada en color rojo). En la rama superior, se muestra, en verde, la secuencia Expansina asociada a la elongación de raíz en plántulas de soja.

Se identificaron cuatro secuencias con función Expansina de mayor homología a la caracterizada en *Medicago truncatula* (Fig. 28). Se consideró también en el análisis la secuencia correspondiente a la Expansina 1 (EXP1) de soja (Fig. 28, en verde, rama superior); de expresión específica en raíces en elongación de plántulas de esta especie (Lee *et al.*, 2003). A partir de estas secuencias, se generaron dos secuencias codificantes (EXPAGm-like y EXPA1-like) para cada una de las cuales se diseñaron 2 pares de cebadores para PCR, con el fin de identificar, aislar y caracterizar Expansinas “putativas” en nuestro modelo en estudio (Tabla 2). Por un lado, EXPAGm-like correspondió a la secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento de las cuatro secuencias codificantes de *Glycine max* de mayor homología con la Expansina de *Medicago truncatula* que participa en germinación y es regulada por ABA (Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). Por otro lado, EXPA1-like fue considerada a partir de la identificación de EXP1 (Lee *et al.*, 2003). La estrategia de

diseño de pares de cebadores para cada una de las dos secuencias comprendió un mismo cebador directo en combinación con dos cebadores reversos, uno de ellos (Rev.1) con secuencias de apareamiento fuera de los dominios conservados para proteínas Expansinas (búsqueda generalizada) y el otro (Rev.2), con apareamiento de secuencia en el interior de dichos dominios conservados, específicos para cada caso.

Tabla 2. Secuencias de cebadores para amplificación por PCR y tamaño de producto esperado para Expansinas putativas de la germinación de semillas de soja.

GEN	Cebador Directo (5'-3')	Cebador Reverso (5'-3')	TAMAÑO PRODUCTO (bp)
EXPAGm-like –Rev.1	TTCTATGGTGGGAGTGATGC	CTGAACCACAACCAAGC	786
EXPAGm-like- Rev. 2		GGACGGTGCTACATTATCTGC	633
EXPA1-like –Rev.1	GGTAGCCTCATTGGATTATGC	GCCTTGATAGAGGGCTTGG	865
EXPA1-like- Rev. 2		TCTGGTCTCTCCATCAGTGG	675

Búsqueda de putativas Expansinas a partir de ADN genómico.

Con la finalidad de validar los pares de cebadores diseñados para las putativas Expansinas en soja, se evaluó la obtención de el/los producto/s de amplificación posibles a partir de las diferentes combinaciones para cada uno de ellos, utilizando como molde para la reacción de PCR el obtenido a partir de ADN genómico. La amplificación resultó en un producto de ~ 1200 pb para EXPA1-like para el par de cebadores Dir./Rev.1 a todas las temperaturas de hibridación analizadas (Fig. 29, calles 2 a 5). Estos resultados confirmaron la presencia de una secuencia amplificable a partir del par de cebadores Dir/Rev.1 diseñado para EXPA1-like. La condición óptima de amplificación fue para una temperatura de hibridación de 55 °C (calle 5), en la cual se obtuvo un sólo producto. No fue posible la obtención de producto para EXPA1-like para el par Dir./Rev. 2 (Fig. 29, calles 7 a 10) ni para EXPAGm-like con ambos pares de cebadores diseñados (Fig. 29, calles 12 a 15 y 17 a 20).

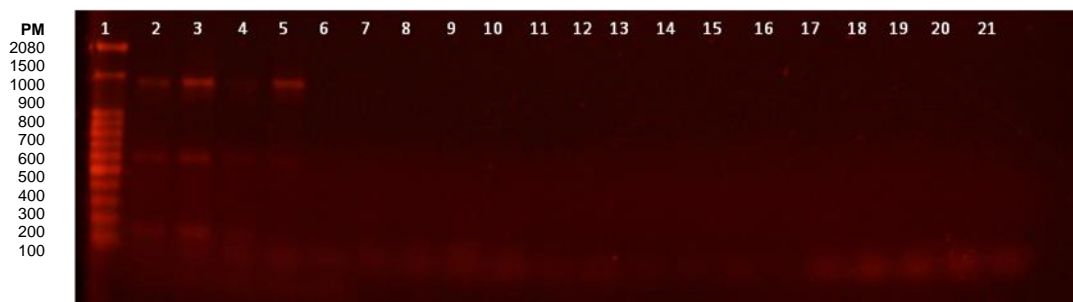


Figura 29. Amplificación de EXPA1-like y EXPAGm-like por reacción de PCR utilizando ADN genómico como molde. Calles: 1- Marcador de PM 100 bp ladder. 2 a 5- EXPA1-like (Dir./Rev.1) en gradiente de temperatura de hibridación. 6- Control (-) EXPA1-like (Dir./Rev.1) sin ADN genómico. 7 a 10- EXPA1-like (Dir./Rev.2) en gradiente de temperatura de hibridación. 11- Control (-) EXPA1-like (Dir./Rev.2) sin ADN genómico. 12 a 15- EXPAGm-like (Dir./Rev.1) en gradiente de temperatura de hibridación. 16- Control (-) EXPAGm-like (Dir./Rev.1) sin ADN genómico. 17 a 20- EXPAGm-like (Dir./Rev.2) en gradiente de temperatura de hibridación. 21- Control (-) EXPAGm-like (Dir./Rev.2) sin ADN genómico. Gradiente de temperatura de hibridación: 49 - 51,3 - 52,7 – 55 °C. Gel de agarosa 1,5%, teñido con BrEt 0.5 µg/µl. La reacción de PCR incluyó 40 ciclos de amplificación.

Búsqueda de putativas Expansinas a partir de ADN copia (ADNc).

Análogamente a los resultados en ADN genómico, la amplificación de EXPA1-like a partir de ADNc fue posible únicamente para el par de cebadores Dir./Rev.1 (datos no mostrados), en tanto no fue posible la obtención de producto para EXPAGm-like con ninguna de las combinaciones de cebadores. El producto obtenido (~ 900 pb) comprendió sólo secuencias codificantes (ADNc) provenientes de ejes embrionales de soja germinados, indicando por lo tanto, que forma parte de los productos de expresión presentes en el tejido blanco durante la germinación. El mismo fue secuenciado en MacroGen Inc. Korea (<http://dna.macrogen.com>) para su identificación, análisis y caracterización.

Análisis de secuencia de ADNc para EXPA1-like.

A partir del producto obtenido por amplificación del ADNc correspondiente a la ZE de ejes embrionales de soja germinados se identificaron las secuencias directa (sentido 5´ - 3´) y reversa (sentido 3´ - 5´). Ambas secuencias fueron posteriormente alineadas de acuerdo a su homología (Sequencher 4.1.4; <https://www.genecodes.com>) obteniéndose la secuencia consenso (Fig. 30), la cual fue analizada en la base de datos disponible para *Glycine max* en el Banco de Genes del NCBI.

```
>Sec. Consenso_EXP1-like
CCTATGCCTTCTCACCTTCTGGATGGACCAATGCCCATGCCACTTTTTATGGGGGTAGTGATGCTTCAGGAACTATGGGGG
GAGCTTGTGGGTATGGGAATCTGTATGCAACTGGGTATGGAAGTGAAGTGCAGCTTTAAGCACTGCCTTATTTAATGATGG
AGCTTCCTGTGGTCAAGTGTACAAAATTATATGTGATTACAAATCAGACTCTAGATGGTGCATCAAAGGAAGATCTGTAACC
GTAAGTCCACAAAATTTTGGCCCTCCCAATTTGCCCCCTTCTAACAACAATGGAGGCTGGTGAACCCACCACTCAAGCATT
TTGATATGGCCCAACCCGCTTGGGAAAAGATTGGTATTTACAGAGGAGGGATCGTCCCCGTGCTATTTCAAAGGGTTCCAT
GCAAAAAGCATGGAGGGGTTAGGTTCAAGTGTGAATGGGAGGGACTACTTTGAGCTAGTATTGATCAGCAATGTGGGGGGT
GCTGGATCCATCCAATCAGTGTTCATTAAGGCTCAAAAAGTGGATGGATGGCAATGTCAAGAAATTGGGGTTCTAATTGGC
AATCCAATGCGTATTTGAATGGTCAATCTTTGTCCTTCAGGGTCACCACCACTGATGGAGAGACCAGAGTTTTCCAAGATAT
TGTTCCAGCAAGTTGGACATTCGGCCAAAATTTCTCTAGCCCAGTTCAGTTCCTAAGCTGATTACAGATAAACCAACCAACGG
CTGAGGCGTGCTTTT
```

Figura 30. Secuencia Consenso (749 nucleótidos) del producto de amplificación (ADNc) obtenido por PCR (EXPA1-like), a partir de ARNm de ZE de ejes embrionales aislados de semillas de soja germinados.

A partir de esta secuencia se realizó una búsqueda por homología de nucleótidos mediante Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn; Fig. 31). Los resultados confirmaron un 100 % de homología del fragmento secuenciado con el ARNm de EXP1 (NM_001250921.2) publicada por Lee *et al.* (2003). Por otro lado la traducción de esta secuencia permitió identificar dominios característicos de proteínas Expansinas.

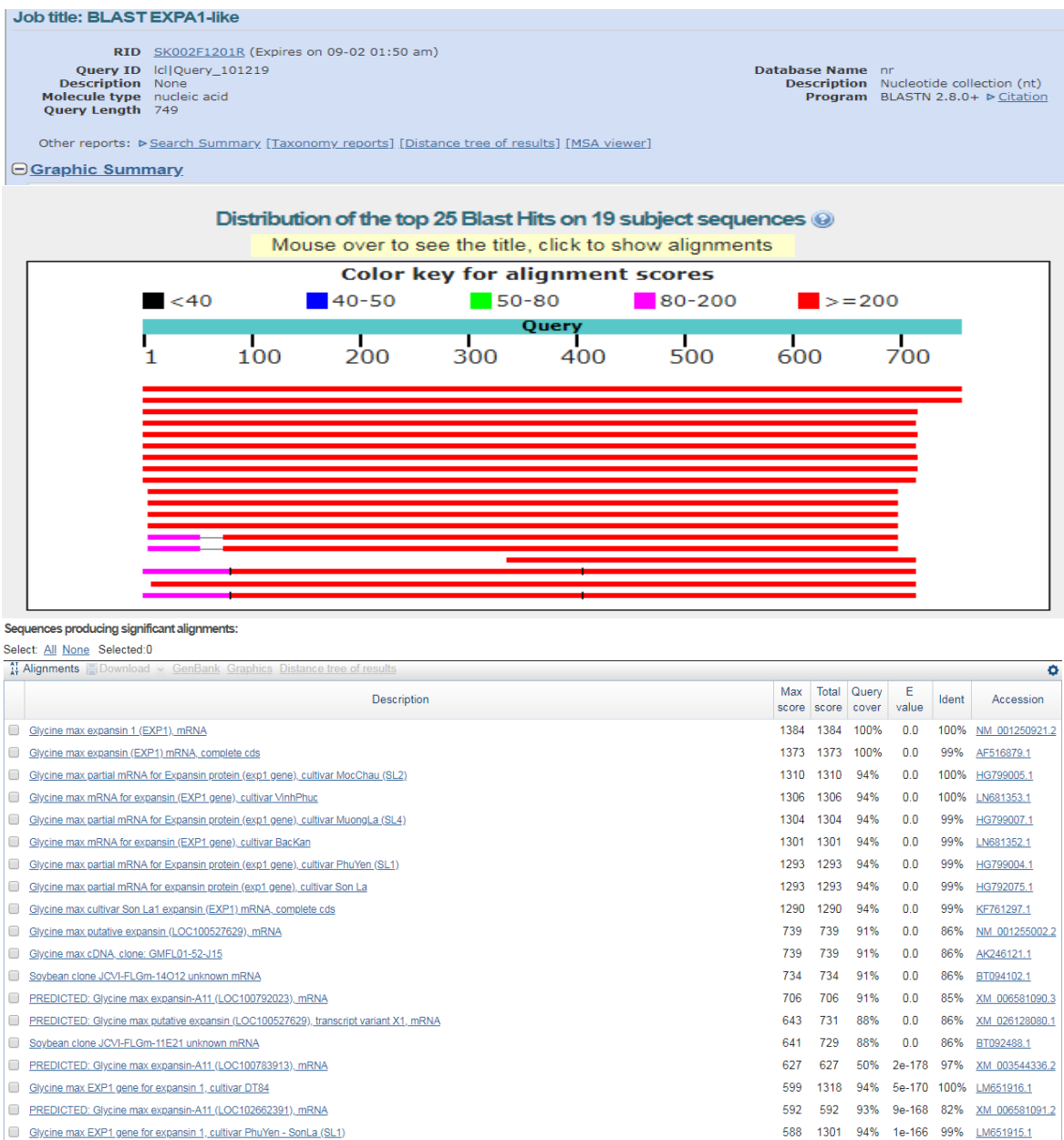


Figura 31. Resultado de la búsqueda por homología de secuencias mediante BLASTn de la EXPA1-like frente a la base de datos de *Glycine max* del NCBI. Se muestran las secuencias que presentaron homología (en orden decreciente) a la secuencia blanco, clasificándose la cobertura de alineamientos de nucleótidos con diferentes colores según se indica en la parte superior de la figura. Debajo, se presenta la descripción para las secuencias encontradas.

En la Figura 32 se muestra el alineamiento de bases entre el transcrito EXPA1-like, las secuencias de ADNc y genómica para EXP1 y la secuencia consenso entre éstas, con diferentes colores para los correspondientes nucleótidos según el nivel de consenso entre ellos. El alineamiento entre secuencias indicó máxima homología entre ambos transcritos y por lo tanto confirmó que el producto amplificado se correspondió con el fragmento del gen EXP1. La secuencia aislada correspondió a ~ 70 % de la longitud completa de EXP1, la cual abarcó parte de los tres exones de transcripción y no incluyó el codón de inicio de traducción para la misma (ATG).

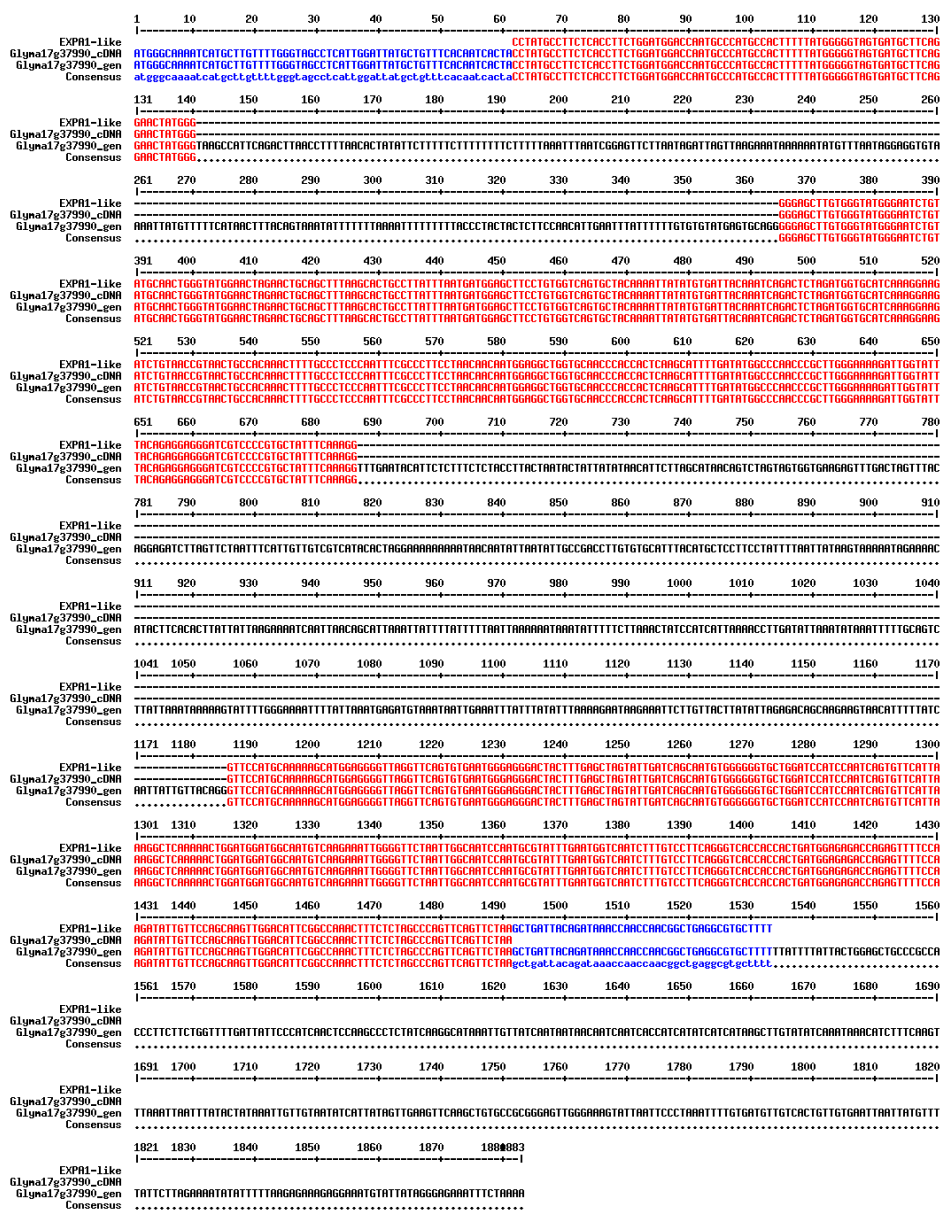


Figura 32. Alineamiento de secuencias para el transcrito EXPA1-like y las secuencias de ADNc y genómica de EXP1 (Glyma17g37990). La cuarta línea (consensus) corresponde a la secuencia consenso entre las primeras.

Análisis de expresión de EXPA1-like por Transcripción Reversa seguida de Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Como un primer abordaje de la expresión de EXPA1-like, se realizaron análisis semicuantitativos mediante RT-PCR a partir de ARNm extraído de ejes embrionales. Si bien estos análisis no son concluyentes para definir niveles de expresión, la presencia, el tamaño e intensidad de banda en los geles de agarosa fueron utilizados como una aproximación visual del grado de expresión para las diferentes condiciones de incubación. Por un lado, los resultados indicaron que EXPA1-like se encontraría presente a tiempo 0 h (Fig. 33, calle 2) y durante la incubación en agua destilada, con intensidades de banda similares en la ZE (Fig. 33, calles 3 y 5) y menor en la fracción que incluyó a ambos extremos (E, plúmula + radícula; Fig. 33, calle 7). Por otra parte, para la incubación en 50 μ M de ABA (Fig. 33, calles 4 y 6), al igual que en buffer pH8 (Fig. 33, calle 8), los niveles de detección de bandas para la ZE resultaron nulos, lo que indicó que la expresión de EXPA1-like estaría inhibida o al menos fuertemente reprimida en estos casos.

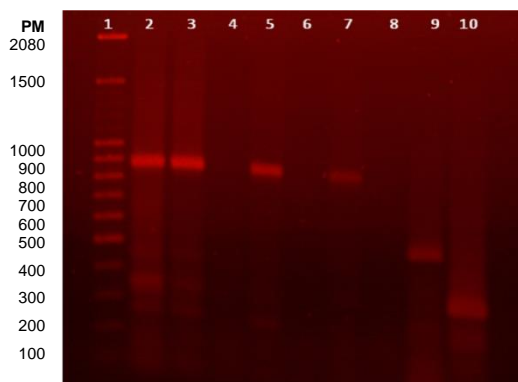


Figura 33. Amplificación de EXPA1-like Dir./Rev.1 por reacción semicuantitativa de RT-PCR para ejes embrionales de semillas de soja en MF. Calles: 1- Marcador de PM 100 bp ladder. 2- EXPA1-like en ZE sin incubación. 3 y 4- EXPA1-like en ZE luego de 6 h de incubación en agua destilada y en solución 50 μ M ABA, respectivamente. 5 y 6- EXPA1-like en ZE luego de 12 h de incubación en agua destilada y en solución 50 μ M ABA, respectivamente. 7- EXPA1-like en E luego de 12 h de incubación en agua destilada. 8- EXPA1-like en ZE luego de 15 h de incubación en buffer pH8. 9- Control de reacción (+) provisto por el kit de reacción de RT-PCR. 10- Control (-) de reacción de RT-PCR (sin molde ARNm inicial). Gel de agarosa 1,5%, teñido con BrEt 0.5 μ g/ μ l. La reacción de RT-PCR incluyó 40 ciclos de amplificación.

Análogamente, en la Fig. 34, se muestran los análisis de la presencia de transcritos de EXPA1-like en ZE de ejes embrionales de soja sometidos a diferentes tratamientos. Nuevamente, la incubación por tiempos crecientes en agua destilada (calles 5 a 9) mostró una mayor intensidad de banda respecto al momento de la cosecha (calle 4), en tanto se detectó la presencia, aunque con baja intensidad, para la incubación en 50 μ M de ABA (calles 10 a 12). Las calles 13 a 16 revelaron una fuerte expresión (mayor grosor e intensidad de banda) de EXPA1-like para la incubación en -1 MPa de PEG. Finalmente, las calles 17 a 22 correspondieron a tiempos de incubación crecientes en agua seguidos de 6 h de incubación en 50 μ M de ABA en todos los casos, con bandas de intensidad intermedia a las correspondientes a la incubación en agua y ABA, respectivamente.

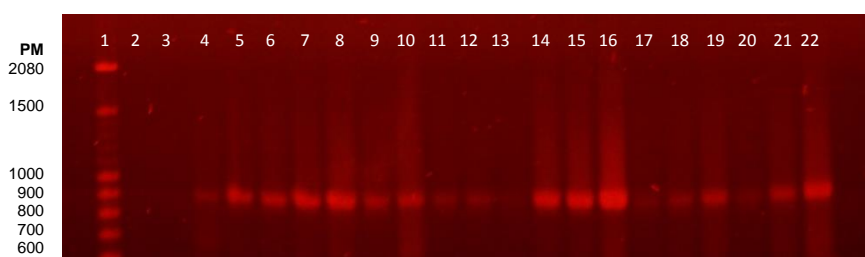


Figura 34. Amplificación de EXPA1-like (Dir./Rev.1) por reacción semicuantitativa de RT-PCR para ZE de ejes embrionales de semillas de soja maduras y secas. Calles: 1- Marcador de PM 100 bp ladder; 2- Control de reacción (+) provisto por el kit de reacción de RT-PCR; 3- Control (-) de reacción de RT-PCR (sin molde ARNm); 4- EXPA1-like sin incubación; 5 a 9- EXPA1-like luego de 6, 12, 18, 24 y 48 h de incubación en agua destilada, respectivamente; 10 a 12- EXPA1-like luego de 2, 4 y 6 h de incubación en solución 50 μ M ABA, respectivamente; 13 a 16- EXPA1-like luego de 2, 4, 6 y 12 h de incubación en -1 MPa de PEG; 17 a 22- EXPA1-like luego de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h de incubación en agua, respectivamente, seguidas de 6 h de incubación en solución 50 μ M ABA. Gel de agarosa 1,5%, teñido con BrEt 0.5 μ g/ μ l. La reacción de RT-PCR incluyó 40 ciclos de amplificación.

Naturaleza del proceso germinativo.

De acuerdo a los resultados previos, el transcripto EXPA1-like se encontró presente en ejes embrionales de semillas de soja maduras y secas (Fig. 33, calle 2 y Fig. 34, calle4), lo cual indicó que el mismo fue generado durante el desarrollo y permanece en el eje embrional como parte de los transcriptos remanentes luego del proceso de deshidratación. Por otro lado, los análisis de expresión semicuantitativos indicarían incrementos de expresión del transcripto para la incubación en agua en tanto habría disminución o, al menos, no inducción para la incubación en ABA (Figs. 33 y 34). Esto planteó el interrogante de si el ABA afectaría estrictamente la síntesis *de novo* del transcripto EXPA1-like, si ejercería su control aguas abajo del mismo (traducción y/o postraducción) o si ambas situaciones serían posibles. Con el propósito de evaluar estos interrogantes, se propuso analizar el efecto para la incubación de ejes embrionales maduros y secos en presencia de α -amanitina (interfiere con la ARN polimerasa II inhibiendo el proceso de transcripción de ADN) o Cicloheximida (interfiere con la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional, e inhibiendo así la síntesis proteica en eucariotas); en ambos casos a concentraciones inhibitorias (100 μ M) para los respectivos procesos (Rajjou *et al.*, 2004). Los ejes embrionales incubados en agua destilada (control) comenzaron a germinar a partir de la sexta hora de incubación, alcanzando el 100 %G antes de las 20 h (Fig. 35). Para la incubación en 100 μ M de α -amanitina se observó tanto un retraso como una disminución en la germinación respecto al control, iniciándose previo a las 20 h y alcanzando un máximo de 80 %G antes de las 50 h de incubación (Fig. 35). Por otra parte, no se registró germinación para la incubación en 100 μ M de Cicloheximida durante el tiempo que duró el experimento (Fig. 35). Los t_{50} fueron, 12 h para los ejes en agua destilada y 40 h para los ejes incubados en α amanitina (Fig. 35).

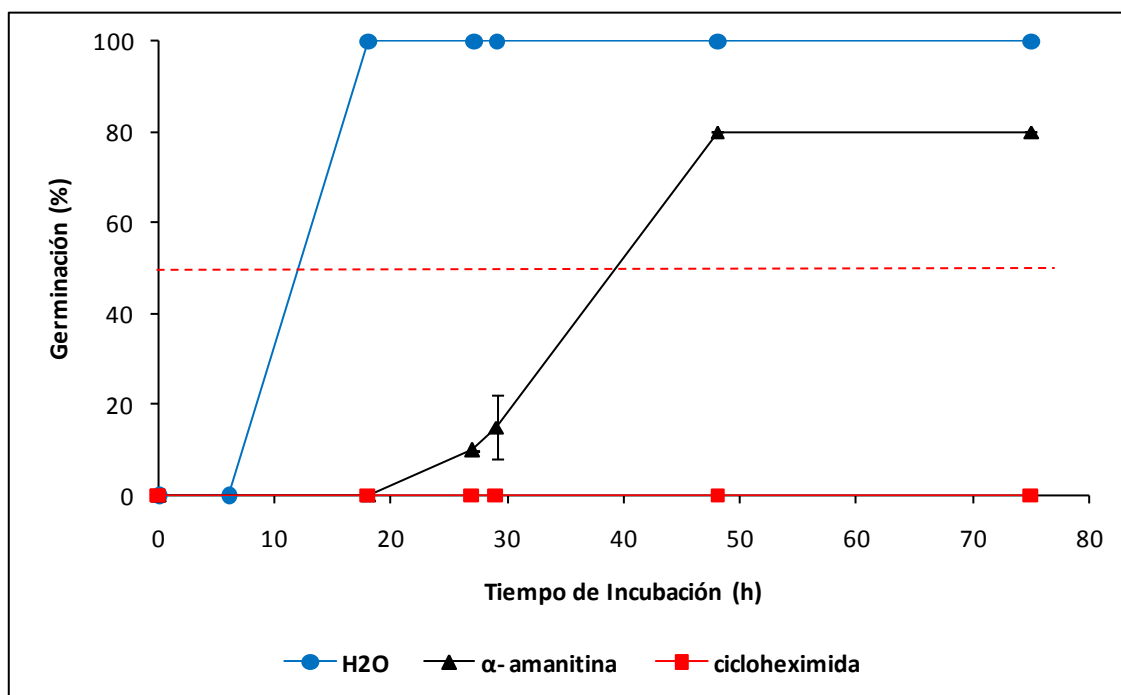


Figura 35. Germinación (%) de ejes embrionales aislados de semillas de soja maduras y secas incubados en agua destilada (control) o soluciones 100 µM de α-amanitina (inhibidor de transcripción) o 100 µM de Cicloheximida (inhibidor de traducción) durante 75 h a 27± 1 °C y oscuridad. La línea de puntos corresponde al 50 %G. Los puntos representan el promedio ± DE para tres réplicas de 10 estructuras cada una.

En la Figura 36 se muestra la ganancia de agua para los ejes embrionales de soja incubados en las tres condiciones precedentes. En agua destilada los ejes describieron la curva trifásica típica: una fase I de imbibición rápida, seguida de una fase II estable entre la segunda y sexta hora de incubación con una ganancia promedio de 6,9 µl de agua y, finalmente, una fase III de ganancia de agua creciente. Respecto al control, los ejes incubados en α-amanitina y Cicloheximida presentaron una fase I análoga, alcanzando la fase II en el mismo momento y con una ganancia promedio de agua similar (6,5 µl). Las diferencias principales entre ambos tratamientos y el control se observaron para la fase III de germinación. En Cicloheximida, los ejes permanecieron en fase II, sin ocurrencia de fase III, hasta el final del experimento. Para la incubación en α-amanitina, la ganancia de agua indicó un aumento leve alrededor de las 20 h (inicio de fase III), con incrementos posteriores de menor magnitud respecto a los registrados para el control. Por ejemplo, la ganancia de agua promedio por eje en el control fue de 24,9 µl a las 30 h y 34,8 µl a las 72 h de incubación, en tanto los valores registrados en α-amanitina fueron 8,9 µl y 12,5 µl, respectivamente.

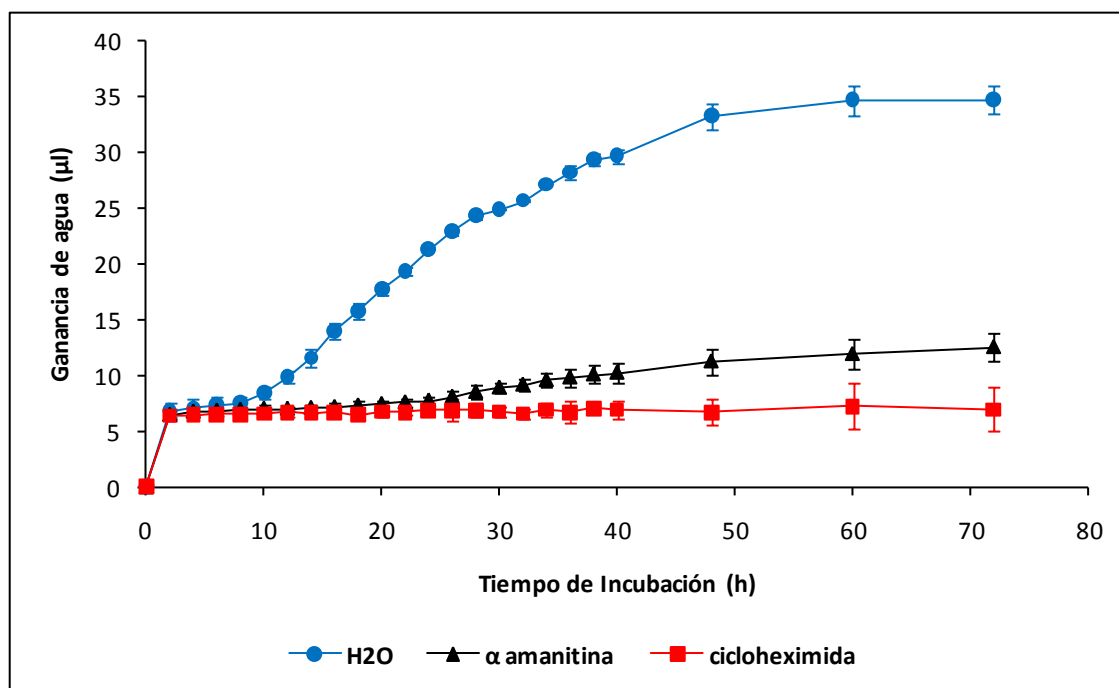


Figura 36. Ganancia de agua (μl) para ejes embrionales y semillas de soja maduras y secas incubados en agua destilada (control) o soluciones $100 \mu\text{M}$ de α - amanitina (inhibidor de transcripción) o $100 \mu\text{M}$ de Cicloheximida (inhibidor de traducción) durante 75 h a $27 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ y oscuridad. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 estructuras cada una.

Estos resultados mostraron que la germinación de ejes embrionales de semillas de soja maduras y secas, dependió estrictamente de la traducción proteica, en tanto fue posible aún en ausencia de nuevos ARNm. No obstante, la síntesis de nuevos transcritos sería requerida para obtener tasas de germinación e imbibición comparables a las registradas en agua destilada. Asimismo, indicarían que el efecto inhibitorio del ABA sobre la germinación operaría afectando la expresión aguas abajo de ARNm almacenados en los ejes embrionales, entre los cuales se encuentra EXPA1-like.

Análisis de expresión de EXPA1-like por RT-qPCR en ejes embrionales de semillas de soja maduras.

Incubación de ejes embrionales maduros y secos en agua destilada.

Con el objetivo de validar las observaciones semicuantitativas por RT-PCR previas (Fig. 34), se efectuaron análisis cuantitativos de expresión de EXPA1-like mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR). Durante la incubación en agua destilada, en condiciones de germinación, los ejes embrionales de semillas maduras y secas comenzaron a evidenciar elongación a partir de las 10 h, presentándose completa y visiblemente alargados a las 12 h. Por su parte, los niveles de EXPA1-like expresados en la ZE de estos ejes relativos al nivel inicial previo a la incubación se incrementaron entre 1,6 y 2,4 veces (Fig. 37), con la mayor expresión relativa alcanzada a las 8 h, e incrementos significativos ($p < 0,05$) a partir de la tercer hora de incubación, confirmando los resultados en los geles de agarosa.

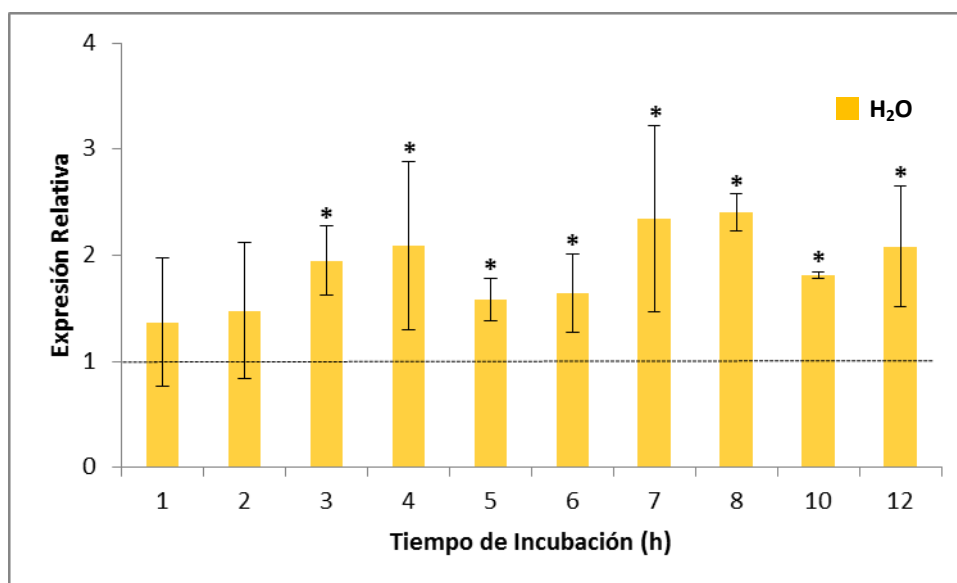


Figura 37. Resultados mediante RT-qPCR para la expresión de EXPA1-like relativa al control sin incubación (línea de puntos), en ZE de ejes embrionales de semillas de soja maduras y secas, luego de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 12 h de incubación en agua destilada a 27 ± 1 °C y oscuridad. (*) diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control. Los análisis se realizaron utilizando el gen de referencia Glyma05g37470. Las barras de error representan el promedio \pm DE para determinaciones por triplicado (réplicas experimentales) sobre dos réplicas biológicas con sus correspondientes tres réplicas técnicas.

Incubación de ejes embrionales maduros y secos en ABA.

A fin de confirmar si los efectos inhibitorios del ABA sobre la germinación afectan cuantitativamente la expresión de EXPA1-like, se evaluó la misma en la ZE de ejes embrionales incubados en solución 50 μM de ABA. Los ejes embrionales inhibieron su elongación durante toda la incubación, presentando niveles de expresión de EXPA1-like relativos al control sin incubación inferiores en todos los tiempos evaluados (Rango de expresión: 0,2 – 0,9), con diferencias significativas a partir de la hora 8 de incubación ($p < 0,05$; Fig. 38).

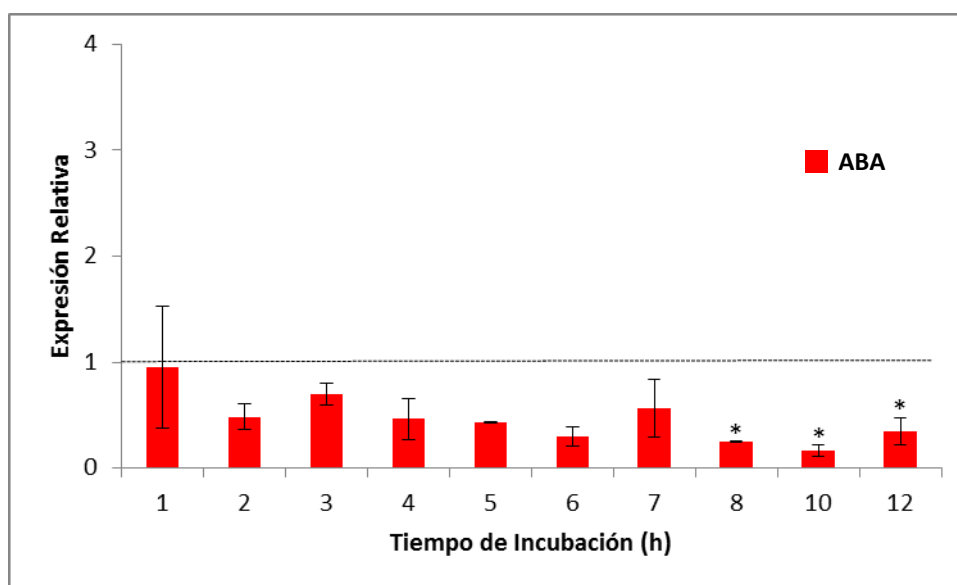


Figura 38. Resultados mediante RT-qPCR para la expresión de EXPA1-like relativa al control sin incubación (línea de puntos), en ZE de ejes embrionales de semillas de soja maduras y secas, luego de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 12 h de incubación en solución 50 μM ABA a 27 ± 1 °C y oscuridad. (*) diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control. Los análisis se realizaron utilizando el gen de referencia Glyma05g37470. Las barras de error representan el promedio \pm DE para determinaciones por triplicado (réplicas experimentales) sobre dos réplicas biológicas con sus correspondientes tres réplicas técnicas.

De igual manera que la inducción de EXPA1-like para la incubación en agua, queda cuantitativamente demostrada la represión de EXPA1-like por ABA para la incubación en presencia de concentraciones de la hormona inhibitorias de la germinación, tal como se infiere a partir del gel de agarosa (Fig. 34).

Incubación de ejes embrionales maduros y secos en agua destilada y transferencia e incubación en ABA.

Siguiendo la línea argumental de análisis previos (Fig. 34), se evaluó también el nivel de expresión de EXPA1-like relativo al control sin incubación para 6 y 12 h de incubación en agua destilada y para incubaciones por 6 y 12 h en agua destilada seguidas por 6 horas en ABA en cada uno de los casos (Fig. 39). Luego de 6 h de incubación en agua destilada, los ejes embrionales se encontraban en fase II. Los ejes que fueron luego transferidos e incubados en ABA 6 horas más, permanecieron en dicha fase durante las 12 h de incubación totales (6 h H₂O + 6 h ABA). La expresión de EXPA1-like relativa al control sin incubación resultó significativamente incrementada (Factor de expresión ~ 1,8; $p < 0,05$) luego de 6 h en agua, en tanto no difirió significativamente para la condición 6 h H₂O + 6 h ABA (Fig. 39). Por el contrario, a las 12 h de incubación en agua destilada, los ejes se encontraban completamente germinados, continuando la elongación aún para el caso de los transferidos e incubados en ABA (12 h H₂O + 6 h ABA). La expresión de EXPA1-like relativa al control sin incubación, resultó mayor luego de 12 h en agua y menor para la condición 12 h H₂O + 6 h ABA, respectivamente, no difiriendo significativamente respecto al control en ambos casos (Fig. 39).

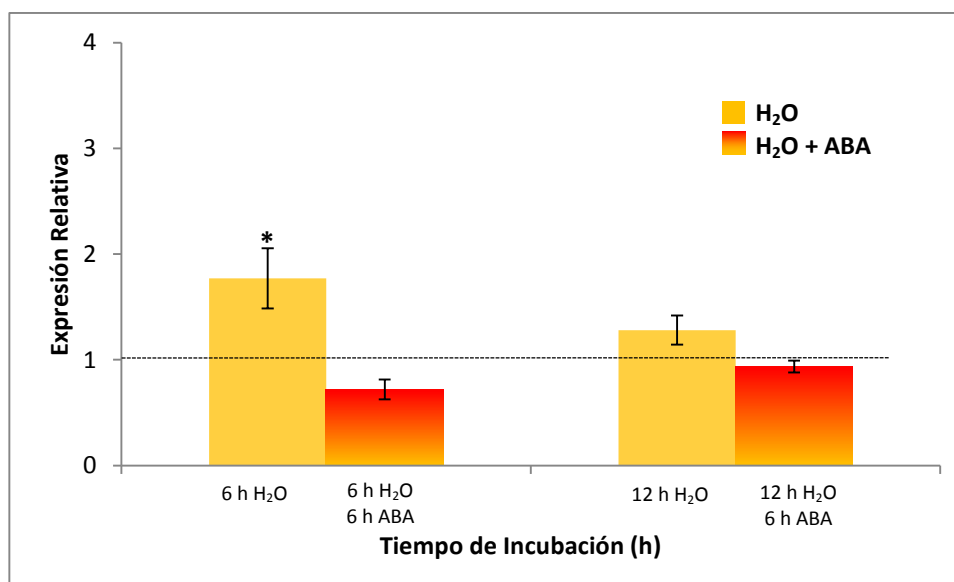


Figura 39. Resultados mediante RT-qPCR para la expresión de EXPA1-like relativa al control sin incubación (línea de puntos) en ZE de ejes embrionales de semillas maduras y secas, luego de 6 y 12 h de incubación en agua destilada (barras amarillas) o 6 y 12 h en agua destilada + 6 h en solución 50 μ M ABA (barras rojo degradado), respectivamente. Las incubaciones se realizaron a 27 ± 1 °C y oscuridad. (*) diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control. Los análisis se realizaron utilizando el gen de referencia Glyma05g37470. Las barras de error representan el promedio \pm DE para determinaciones por triplicado (réplicas experimentales) sobre dos réplicas biológicas con sus correspondientes tres réplicas técnicas.

Incubación de ejes embrionales en madurez fisiológica en agua destilada y ABA.

La diferencia más evidente entre las semillas de soja que alcanzan la madurez fisiológica (45 DDA) y las maduras y secas (>60 DDA) es que las primeras no han iniciado el proceso de desecación que caracteriza la etapa de final de desarrollo para semillas ortodoxas. Sin embargo, se determinó que las [ABA]e son similares en ambos casos (Gosparini, 2002); por lo que los estudios de expresión para EXPA1-like en relación al control por ABA para 45 DDA se basaron nuevamente en comparaciones entre incubaciones de estos ejes embrionales en agua destilada o soluciones 50 μ M de ABA. Similarmente a lo observado en la ZE de ejes de semillas maduras y secas, los niveles de expresión de EXPA1-like resultaron significativamente aumentados (\sim 2 veces en promedio; $p < 0,05$) en agua destilada y disminuidos (\sim 0,6 veces en promedio; $p < 0,05$) en ABA, luego de las respectivas incubaciones tanto para 6 como 12 h (Fig. 40).

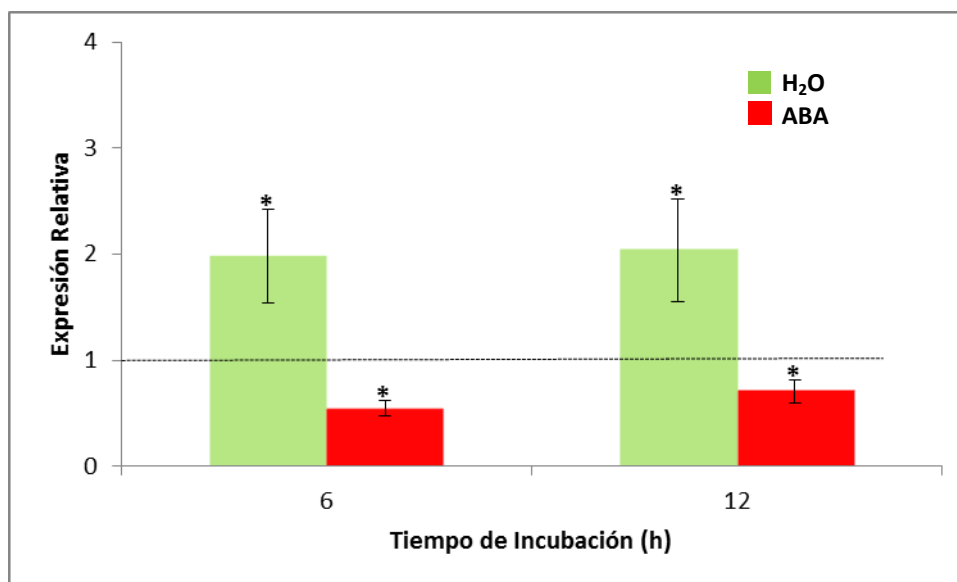


Figura 40. Resultados mediante RT-qPCR para la expresión de EXPA1-like relativa al control sin incubación (línea de puntos), en ZE de ejes embrionales de semillas de soja en MF, luego de 6 y 12 h de incubación en agua destilada (barras verdes) o en solución 50 μ M ABA (barras rojas) a 27 ± 1 °C y oscuridad. (*) diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control. Los análisis se realizaron utilizando el gen de referencia Glyma05g37470. Las barras de error representan el promedio \pm DE para determinaciones por triplicado (réplicas experimentales) sobre dos réplicas biológicas con sus correspondientes tres réplicas técnicas.

De esta manera se confirman nuevamente las observaciones hechas a partir del gel de agarosa (Fig. 33). Por otra parte, los resultados mostrados en las Figuras 39 y 40 están de acuerdo con los de germinación (Fig.15) y dinámica de imbibición (Fig.16) que indicaron una ventana de acción para ABA alrededor de la sexta hora de incubación, momento a partir del cual el ABA perdió su efecto inhibitorio.

Incubación de ejes embrionales maduros y secos en PEG de $\Psi_a = -1$ MPa y buffer pH8.

La inhibición de la germinación de ejes embrionales de soja en soluciones tanto de $\Psi_a = -1$ MPa como buffer pH8 fue visualizada como un impedimento estrictamente a la concreción de la fase III de imbibición. En el primer caso, la baja disponibilidad de agua libre permitió alcanzar la fase II pero resultó insuficiente para llevar adelante la expansión celular. En el segundo caso, se asoció la respuesta a las condiciones subóptimas para la actividad de las Expansinas, impidiendo el relajamiento de las paredes celulares necesario para el ingreso de agua y el consecuente alargamiento celular. Sin embargo, en ningún caso se hace referencia a un efecto esperado sobre la expresión de Expansinas a nivel transcripcional. Adicionalmente, a pesar de la similitud de respuesta en términos de germinación y dinámica de absorción hídrica, las bandas en los geles de agarosa generados en los análisis preliminares por RT-PCR revelaron una disminución (o ausencia), y un aumento para la expresión de EXPA1-like en buffer pH8 y PEG, respectivamente (Figs. 33 y 34). A fin de aportar rigurosidad a estos resultados, se cuantificó por RT-qPCR la presencia del transcripto EXPA1-like en la ZE de ejes embrionales de semillas de soja maduras y secas durante la incubación en solución de PEG de $\Psi_a = -1$ MPa y en buffer pH8. Los niveles de expresión de EXPA1-like en ambos medios de incubación confirmaron las observaciones previamente descriptas, con magnitudes significativas ($p < 0,05$) tanto para la sobreexpresión durante los tratamientos en PEG (Rango de expresión: 2,5 - 3,4) como para la disminución en buffer pH8 (Rango de expresión: 0,1 - 0,2) respecto al control previo a la incubación (Fig. 41).

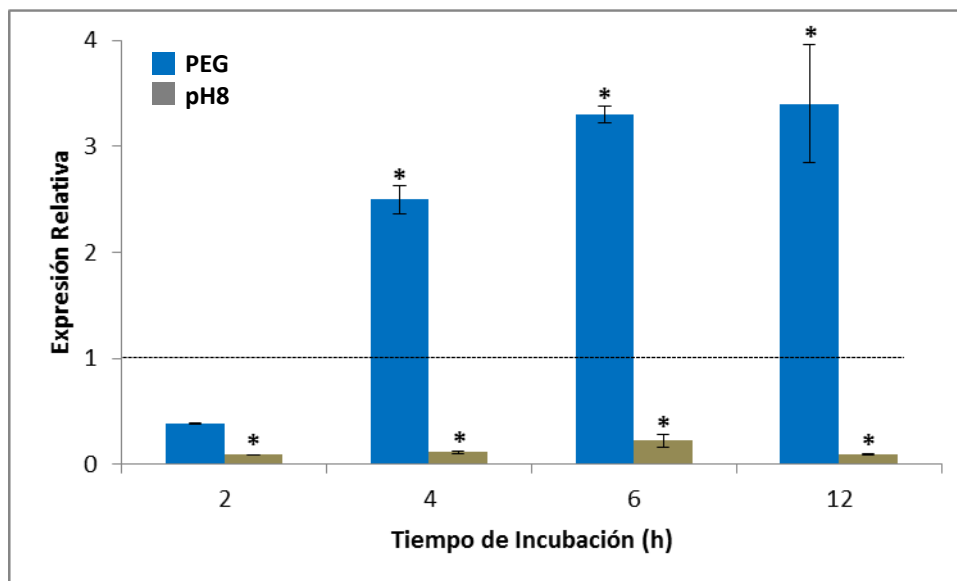


Figura 41. Resultados mediante RT-qPCR para la expresión de EXPA1-like relativa al control sin incubación (línea de puntos), en ZE de ejes embrionales de semillas maduras y secas luego de 2, 4, 6 y 12 h de incubación en solución de PEG de $\Psi_a = -1$ MPa (barras azules) y buffer pH8 (barras grises) 27 ± 1 °C y oscuridad. (*) diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control. Los análisis se realizaron utilizando el gen de referencia Glyma05g37470. Las barras de error representan el promedio \pm DE para determinaciones por triplicado (réplicas experimentales) sobre dos réplicas biológicas con sus correspondientes tres réplicas técnicas.

Dinámica de germinación de ejes embrionales y semillas de soja en desarrollo.

Los resultados presentados hasta el momento describieron la germinación y su control para semillas o ejes embrionales de soja maduros. En esta etapa del desarrollo seminal queda claro que las [ABA]_e se encuentran por debajo del umbral inhibitorio para la germinación, por lo que la presencia de ABA exógeno en el medio de incubación fue requerida para evaluar el efecto del mismo sobre la germinación y establecer la posible relación entre éste y la expresión del transcrito EXPA1-like.

En adelante, se considerará la germinación para estas semillas y ejes embrionales durante el desarrollo hacia la madurez, previo a su deshidratación. En estos casos, se establecieron tasas de germinación crecientes con la edad, definidas de acuerdo a los niveles endógenos de ABA decrecientes de los ejes embrionales. Para 25 DDA, la germinación se inició después de las 12 y 72 h para ejes y semillas, respectivamente (Fig. 42A). Para 30 DDA, los ejes iniciaron la germinación antes de las 12 h y las semillas a partir de las 48 h (Fig. 42B). En 35 DDA, los ejes comenzaron a germinar en las primeras horas del experimento y las semillas luego de las 24 h (Fig. 42C). Para 40 DDA, los ejes iniciaron la germinación simultáneamente aunque a mayor tasa que para 35 DDA, en tanto las semillas lo hicieron a partir de las 12 h (Fig. 42D). En 45 DDA (MF), ambas estructuras analizadas iniciaron su germinación durante las primeras horas de incubación, los ejes más rápido que las semillas (Fig. 42E). Los %G máximos al cabo de 168 h de incubación, tanto para ejes como para semillas, resultaron crecientes con la edad y fueron, para cada edad, mayores en ejes que en semillas (Tabla 3). Adicionalmente, la velocidad de germinación para cada estructura fue mayor cuanto mayor fue el grado de desarrollo (DDA) y, entre estructuras, los ejes superaron a las semillas en todos los casos, tal como muestran las dinámicas de germinación (Fig. 42) e indican los valores de t_{50} (Tabla 3). Las semillas de 25 y 30 DAA presentaron %G máximos inferiores al 50% durante las 168 h que duró el experimento (Fig. 42).

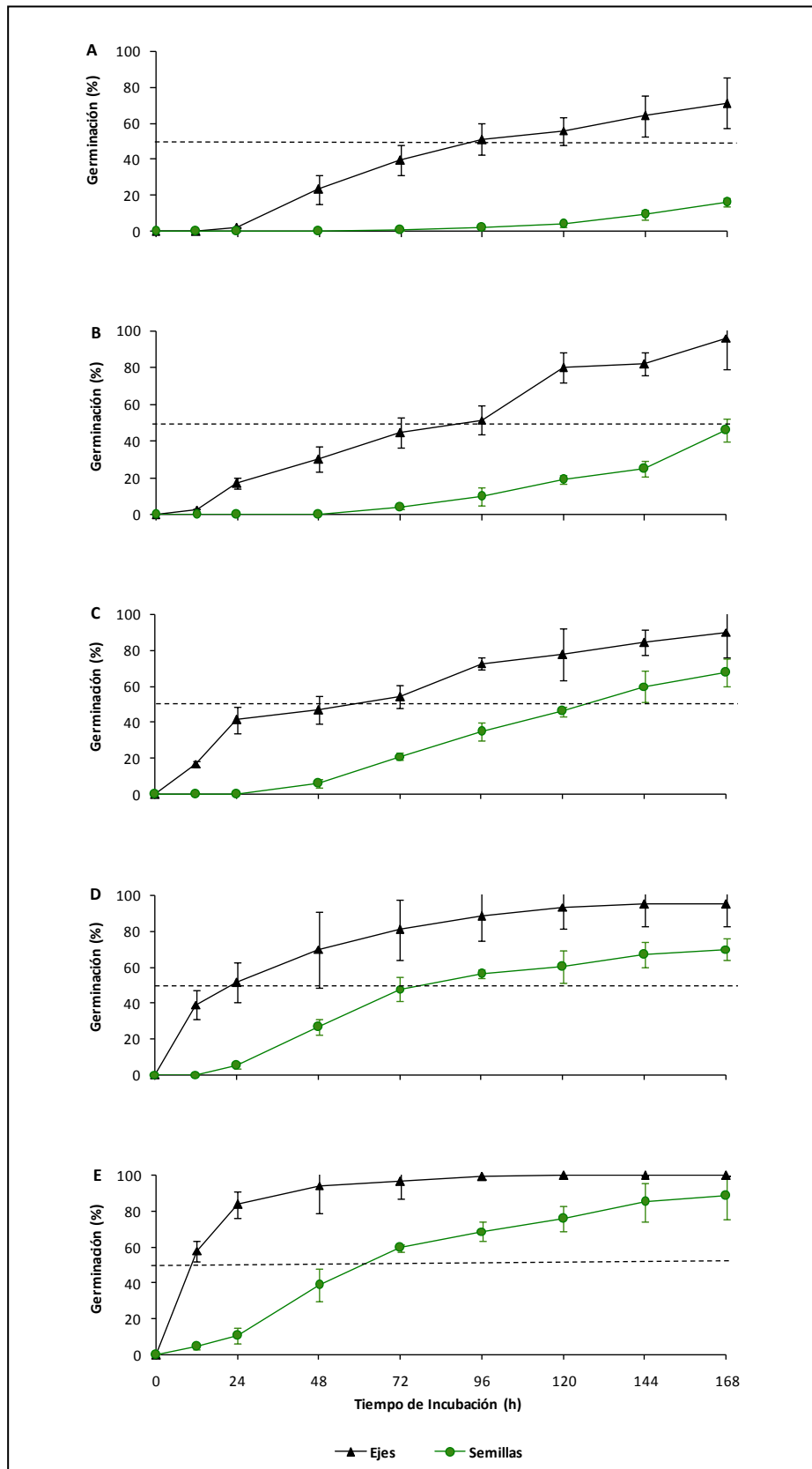


Figura 42. Germinación (%) de ejes embrionales y semillas de soja de A) 25, B) 30, C) 35, D) 40 y E) 45 días después de antesis (MF), incubados en agua destilada durante 168 h a 27 ± 1 °C y oscuridad. La línea de puntos corresponde al 50 %G. Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 estructuras cada una.

Tabla 3. Porcentajes de Germinación máximos ($G_{m\acute{a}x}$) y tiempos al 50 % de germinación (t_{50}) para semillas y ejes embrionales de soja de 25, 30, 35, 40 y 45 días después de antesis (DDA) incubados en agua destilada durante 168 h a 27 ± 1 °C y oscuridad.

Edad (DDA)	Semillas		Ejes Embrionales	
	$G_{m\acute{a}x}$ (%)	t_{50} (h)	$G_{m\acute{a}x}$ (%)	t_{50} (h)
25	16	--(*)	70	93,3
30	46	--(*)	95	90,5
35	68	126,9	90	60,0
40	70	78,7	95	22,6
45	88	61,1	100	10,4

(*) No se alcanzó el t_{50} en el tiempo del experimento.

Las mayores velocidades de germinación para los ejes embrionales o semillas a medida que se avanzó en el desarrollo (t_{50} , Tabla 3) podrían explicarse principalmente por las concentraciones decrecientes de ABA en los correspondientes ejes ([ABA]e; Tabla 4), en tanto las diferencias entre ejes y semillas para cada edad consideran la presencia del tegumento, el cual constituye una restricción adicional a la germinación en las semillas (Montechiarini *et al.*, 2015).

Concentraciones de Ácido Abscísico en ejes embrionales de semillas de soja en desarrollo.

En la Tabla 4 se presenta la concentración de ABA de los ejes embrionales ([ABA]e) de semillas de soja al momento de ser separadas de la planta madre, para 25, 30, 35, 40 y 45 DDA.

Tabla 4. Concentración de Ácido Abscísico en ejes embrionales ([ABA]e) de semillas de soja de 25, 30, 35, 40 y 45 días después de antesis (DDA). Los valores representan el promedio \pm DE de 10 ejes embrionales por edad.

DDA	[ABA]e ($\mu\text{g.g.PS}^{-1}$)
25	14,45 ($\pm 1,1$)
30	13,14 ($\pm 2,1$)
35	5,15 ($\pm 0,2$)
40	4,57 ($\pm 1,2$)
45	1,80 ($\pm 0,6$)

Las semillas de soja que alcanzaron la madurez fisiológica (45 DDA) presentaron una [ABA]_e muy baja, similar a lo medido en semillas de soja maduras y secas (Gosparini, 2002), por lo que naturalmente no presentan dormición y efectivamente germinan cuando son colocadas en condiciones apropiadas de humedad, temperatura y oxígeno (Gosparini *et al.*, 2007). Por su parte, semillas y ejes embrionales aislados de 25 a 40 DDA presentaron un retraso en la germinación, tanto mayor cuanto menor fue la edad, tal como indican los valores de t_{50} (Tabla 3, Fig. 42). Para estos ejes embrionales inmaduros, la restricción a la germinación se atribuyó a la elevada [ABA]_e, siendo necesario el descenso de la misma hasta un valor umbral o crítico, a partir del cual la germinación es posible. Dicho valor es alcanzado en el transcurso de la incubación en condiciones de germinación (Fig. 43), con tasas de caída más pronunciadas en las primeras horas de incubación, tanto mayores cuanto mayor es la [ABA]_e (Fig. 43, $t = 0$ h).

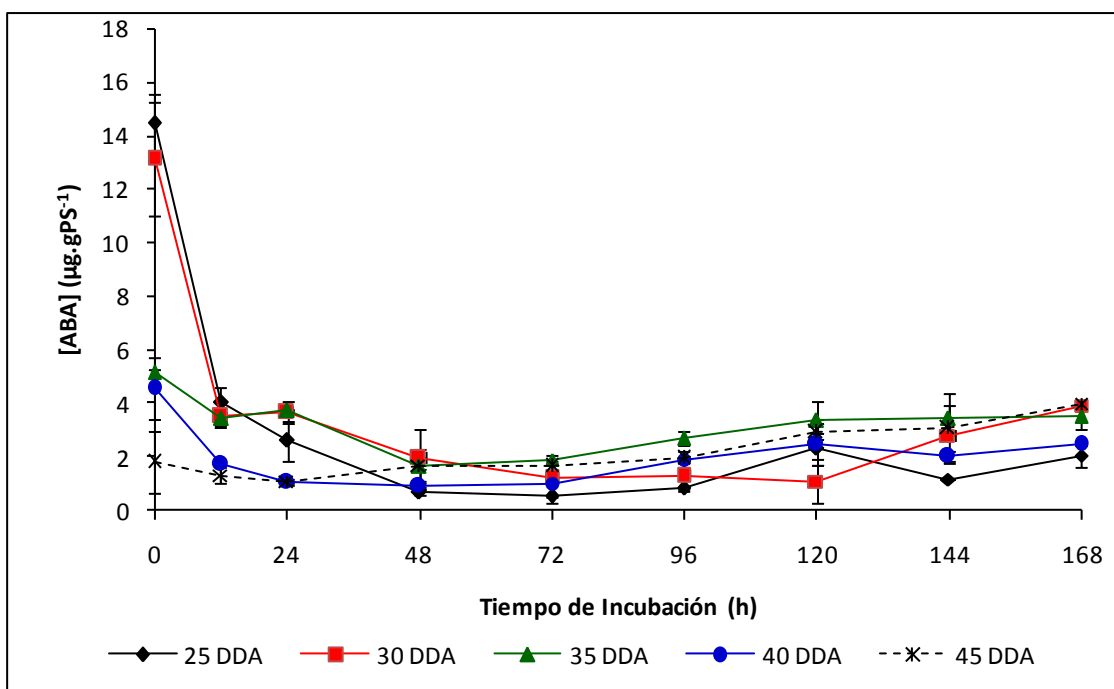


Figura 43. Evolución de la concentración de Ácido Abscísico ($\mu\text{g.g.PS}^{-1}$) de ejes embrionales de soja, de 25, 30, 35, 40 y 45 días después de antesis (DDA) incubados durante 168 h en agua destilada a 27 ± 1 °C y oscuridad. Los puntos representan el promedio \pm DE de 10 ejes embrionales por edad.

Análisis de expresión de EXPA1-like por RT-qPCR en ejes embrionales de semillas de soja durante el desarrollo.

Tanto en base a los antecedentes como a partir del presente trabajo, resulta evidente que la germinación de semillas y ejes embrionales de soja en MF y maduros y secos no presenta restricciones por ABA, aunque aún es posible establecer la inhibición frente al agregado exógeno de altas concentraciones de la hormona. Se estableció además la inducción en la expresión de EXPA1-like en la ZE de ejes embrionales durante la incubación en condiciones de germinación en agua destilada. Por otra parte, los niveles del transcripto en esta misma ZE resultaron reprimidos para la incubación en 50 μ M de ABA. Esto propone a EXPA1-like como participante importante de los eventos que definen la germinación en soja y un blanco clave de regulación por ABA.

Una situación diferente se presenta para semillas y ejes embrionales inmaduros de soja, donde la germinación resulta controlada principalmente por los niveles de [ABA]_e, mostrando %G_{máx} crecientes (Tabla 3) a medida que esta concentración desciende con la edad (Tabla 4). A su vez, para cada edad, la caída de la [ABA]_e durante la incubación en condiciones de germinación (Fig. 43) determinó que las tasas de germinación sean mayores desde 25 a 45 DDA (t_{50} , Tabla 3). Resta ahora establecer la posible relación entre la [ABA]_e y los niveles de transcripto EXPA1-like para cada una de las edades del desarrollo en estudio, así como para cada edad durante la incubación en condiciones de germinación.

De acuerdo a los resultados por RT-PCR en ejes embrionales maduros y secos de soja (>60 DDA, Fig. 34), el transcripto EXPA1-like se encontró presente previo a la incubación, siendo por lo tanto sintetizado durante el desarrollo seminal y formando parte de los transcriptos que permanecen almacenados a la madurez. Por lo tanto, se analizó la expresión de EXPA1-like en la ZE para ejes embrionales durante el desarrollo y hasta la madurez, al momento de la cosecha. Respecto a 25 DDA (Fig. 44, línea de puntos en el inserto), los niveles de expresión del transcripto EXPA1-like resultaron significativamente incrementados hacia la madurez ($p < 0,05$), con magnitudes similares para 30, 35 y 40 DDA (entre 6 y 10 veces) y muy superiores para 45 (~ 150 veces) y 60 (~ 250 veces) DDA (Fig. 44). Dichos resultados guardaron una relación con los datos de germinación *in vitro*, la cual fue creciente con la edad, en respuesta a la disminución de la [ABA]_e hasta valores no inhibitorios a la madurez (Tabla 4).

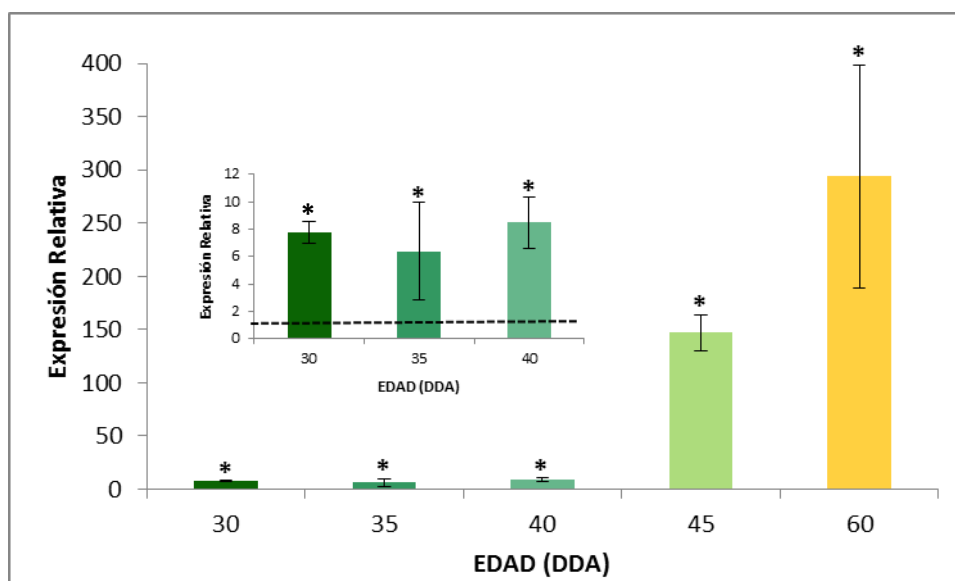


Figura 44. Resultados mediante RT-qPCR para la expresión de EXPA1-like relativa al nivel en 25 DDA (línea de puntos en el inserto), en ZE de ejes embrionales de semillas de soja de 30, 35, 40, 45 y 60 días después de anthesis (DDA). (*) diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a 25 DDA. Los análisis se realizaron utilizando el gen de referencia Glyma05g37470. Las barras de error representan el promedio \pm DE para determinaciones por triplicado (réplicas experimentales) sobre dos réplicas biológicas con sus correspondientes tres réplicas técnicas.

Análisis de expresión de EXPA1-like por RT-qPCR en ejes embrionales de semillas de soja inmaduras incubados en agua destilada.

Del mismo modo que se cuantificaron los niveles de EXPA1-like en la ZE de ejes embrionales de 25 a >60 DDA, se evaluó la expresión para cada edad durante la incubación en condiciones de germinación. En 25 DDA, los ejes embrionales evaluados comenzaron a alargarse notoriamente a partir de las 30 h de incubación, completando la germinación a las 36 h. En 30 DDA, el inicio y la finalización de la germinación ocurrieron a las 12 y 15 h, respectivamente. Para 35 y 40 DDA, la germinación se completó alrededor de las 10 h de incubación. Respecto a la expresión de EXPA1-like para estos mismos ejes se encontró que, en términos generales, para todas las edades, los niveles de transcripto resultaron significativamente incrementados ($p < 0,05$) en el transcurso de la incubación respecto al control sin incubación (Fig. 45). Cabe resaltar que los tiempos de incubación analizados difirieron en las diferentes edades, respetando las dinámicas de absorción hídricas, de manera de abarcar en las determinaciones, desde el inicio a la concreción de la germinación para cada caso.

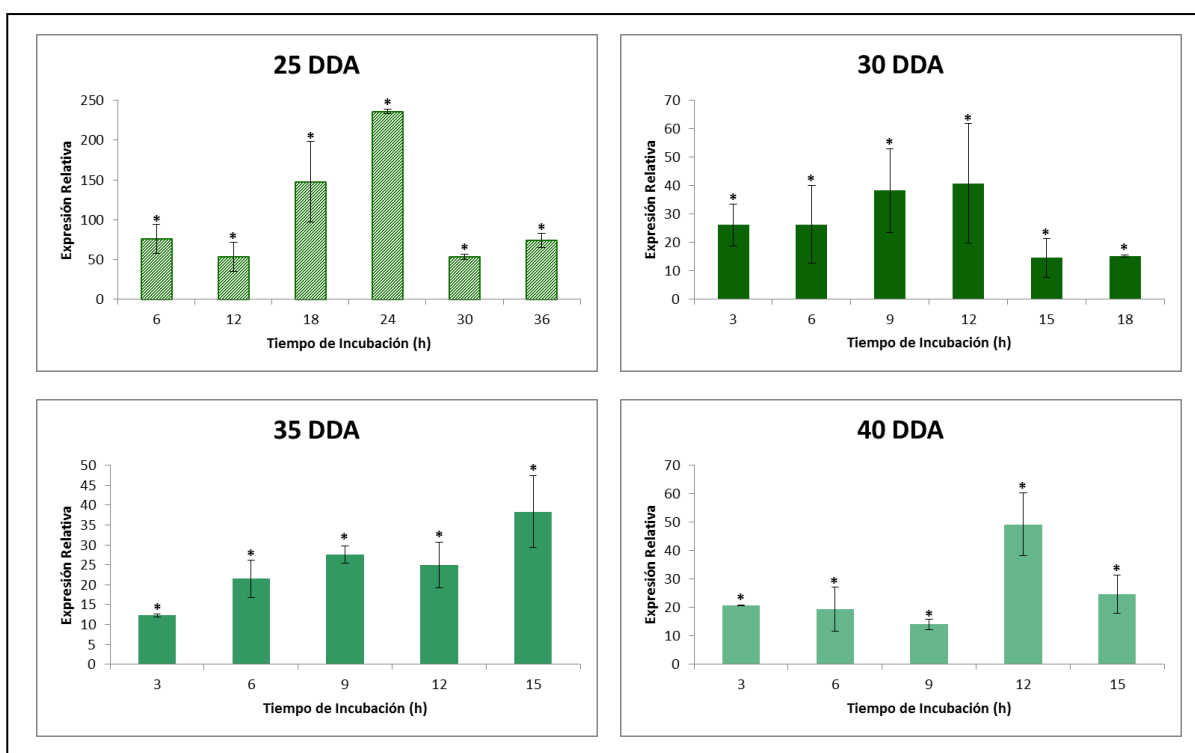


Figura 45. Resultados mediante RT-qPCR para la expresión de EXPA1-like relativa al control sin incubación, en ZE de ejes embrionales de semillas de soja de 25, 30, 35 y 40 días después de antesis (DDA), para la incubación en agua destilada 27 ± 1 °C y oscuridad. (*) diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control. Los análisis se realizaron utilizando el gen de referencia Glyma05g37470. Las barras de error representan el promedio \pm DE para determinaciones por triplicado (réplicas experimentales) sobre dos réplicas biológicas con sus correspondientes tres réplicas técnicas.

En 25 DDA, los incrementos de EXPA1-like en el transcurso de la incubación estuvieron en el orden de 50 a 250 veces relativos al control sin incubación (Fig. 45). Para 30, 35 y 40 DDA, estos incrementos variaron, en promedio, en un rango de 10 a 40 veces respecto al control sin incubación correspondiente a cada edad (Fig. 45).

Analizados en conjunto, estos resultados permitieron inferir que un comportamiento similar al encontrado para ejes embrionales maduros de soja incubados en agua o $50 \mu\text{M}$ de ABA es también posible para estos ejes embrionales durante el desarrollo. En este último caso, tanto los niveles crecientes de EXPA1-like desde 25 a 40 DDA (Fig. 44) como los incrementos de expresión del transcrito para cada edad durante la incubación en condiciones de germinación (Fig. 45), estuvieron de acuerdo con la evolución de la [ABA]e presentada para cada situación (Tabla 4 y Fig.43, respectivamente).

DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis abordaron la caracterización del rol del ABA en el control de la expresión de genes que regulan aspectos específicos del programa de germinación de semillas de soja. En particular, se logró el aislamiento e identificación de un transcripto Expansina, denominado EXPA1-like, cuya función primaria en los eventos de debilitamiento de pared celular que dan lugar a los procesos expansivos en vegetales, proponen al mismo como una biomolécula decisiva para la germinación de semillas de soja, al tiempo que lo constituyen en un candidato clave de control por ABA en su rol inhibitorio de la misma. Por lo tanto, el estudio de aspectos fisiológicos y moleculares relacionados a la germinación de semillas de soja maduras y secas y su control por ABA exógeno constituyó la base para determinar y evaluar la posible función del ABA presente en los ejes embrionales de las semillas inmaduras en el control de la germinación de las mismas durante el desarrollo.

El análisis de la dinámica de germinación proporciona información sobre el ritmo, uniformidad y extensión del proceso germinativo para una población de semillas (Bewley *et al.*, 2013). Por otra parte, la germinación en sentido estricto considera al eje embrional de estas semillas como el principal órgano responsable de su concreción, contribuyendo los demás órganos seminales al éxito del proceso sin estar directamente implicados. Esto es claramente evidente a partir de la Figura 7 que muestra la mayor velocidad de germinación para los ejes embrionales aislados respecto a las semillas de soja enteras. El contacto directo del órgano blanco con el medio de imbibición, sumado al hecho de la ausencia de estructuras masivas capaces de absorber agua (en una semilla de soja completa los ejes representan el 3%, el 14 % corresponde al tegumento y el 83 % restante a cotiledones), determinan la diferencia de velocidades en ambos casos. En este sentido, el análisis de la ganancia de agua durante la incubación es una herramienta de gran utilidad para evaluar el progreso del proceso germinativo (Nonogaki *et al.*, 2010), permitiendo exponer claramente el comportamiento particular de las semillas y los ejes embrionales aislados de soja durante la incubación (Fig. 8). La duración de las Fases I y II de imbibición para las semillas maduras y secas fue de 4 y 8 h, respectivamente, iniciando la germinación (Fase III) a las 12 h; en tanto, para los ejes embrionales, cada una de las etapas demandó la mitad de tiempo (2 h fase I, 4 h fase II, 6 h inicio fase III). Adicionalmente, si bien la ganancia de agua unitaria al

inicio de la germinación resultó 5 veces superior en las semillas (30 μ l) respecto a los ejes embrionales (6 μ l), en este último caso la misma estuvo confinada estrictamente al órgano blanco. Esto explica las diferencias observadas en germinación entre los lotes de ejes y semillas (Fig. 7), con el 100 %G alcanzado a las 48 y 72 h, respectivamente.

Por otra parte, las dinámicas de absorción hídrica resultan también una herramienta valiosa en cuanto a la descripción gráfica de la naturaleza expansiva del proceso de germinación, el cual quedó demostrado en varias especies, no implica eventos de división celular sino es conducido por cambios de plasticidad en las paredes celulares en respuesta al ingreso de agua al interior de las células en crecimiento (Bewley *et al.*, 2013). Esto determina además que la tasa de ingreso de agua en la semilla sea crítica para el éxito de la germinación. Si el ingreso es muy rápido, los distintos tejidos de las semillas podrían resultar con daño imbibicional. Por el contrario, si el ingreso de agua es muy lento, la germinación será reducida pudiendo ocasionar deterioro en las semillas (Bewley y Black, 1994). Durante la hidratación de una semilla, el ingreso de agua a las células está conducido por el gradiente de potencial agua (ψ_a) entre el medio de incubación y los tejidos seminales. Por lo tanto, una forma de evaluar la germinación resultó de la incubación de ejes embrionales maduros y secos en soluciones de Polietilenglicol 8000 (PEG) de diferentes ψ_a . En términos generales, cuanto menor ψ_a de la solución de incubación, menor ganancia de agua por parte de los ejes embrionales y, consecuentemente, la fase II resultó tanto más prolongada, pudiendo, eventualmente, completarse la germinación, tal como ocurrió para las incubaciones en $\psi_a = 0$; -0,125; -0,25 y -0,5 MPa, con permanencia en fase II progresiva y altos %G alcanzados (Fig. 9). En tanto, si el valor del ψ_a es lo suficientemente bajo se evitará la germinación, como ocurrió para las soluciones de -1 y -1,5 MPa (Fig. 9). Para las primeras condiciones, los valores crecientes de t_{50} a ψ_a decrecientes, constituyeron una evidencia cuantitativa del retraso en la germinación. En todos los casos, la reducción del ψ_a del medio de incubación limitó la disponibilidad de agua a las células en contacto con dicho medio, retrasando o aún impidiendo la generación de suficiente presión hidrostática para germinar (Bradford y Nonogaki, 2007). Adicionalmente, la cantidad de agua absorbida por eje embrional resultó menor cuanto más bajo fue el ψ_a de la solución, con tiempos de duración de fase I similares (2 h) para 0; -0,125; -0,25 y -0,5 MPa y mayores (4 h) para -1 y -1,5 MPa, en las cuales se registró además

pérdida de peso hacia el final de la incubación (Fig.10). Finalmente, la restricción osmótica sobre la germinación quedó claramente demostrada cuando aquellos ejes embrionales incapaces de germinar por 24 h en $\psi_a = -1$ MPa fueron transferidos e inmediatamente incubados otras 24 h en un $\psi_a = 0$ MPa (agua destilada, Fig. 11). Para esta nueva condición, los ejes que ya se encontraban en fase II prolongada durante la incubación en PEG, permanecieron en dicha fase durante tres horas más luego de la transferencia a agua (27 h de incubación totales), a partir de lo cual germinaron rápidamente y continuaron la ganancia de peso. A partir de estos resultados se infiere que, si bien el bajo ψ_a del medio de incubación no permitió desarrollar la presión hidrostática necesaria para inducir el alargamiento celular, no habría afectado sustancialmente la activación metabólica de los ejes embrionales que naturalmente ocurre durante las primeras fases de imbibición en condiciones propicias para la germinación; dando lugar a una rápida respuesta al proceso luego de la transferencia a agua destilada (Fig. 11). Una situación similar es utilizada como fundamento de la técnica de priming, donde semillas con tasas naturales de germinación muy bajas y/o heterogéneas son inicialmente incubadas bajo restricción osmótica hasta la fase II, activando su metabolismo aunque sin iniciar la fase III, para ser luego deshidratadas a un nivel próximo al inicial, posibilitando finalmente una germinación más rápida y sincrónica de las mismas en agua (Halmer, 2004).

Otros antecedentes que ratifican la naturaleza expansiva de la germinación en diferentes especies avalan su control por diversos efectores moleculares (hormonales y/o químicos), tanto positivo como negativo, los cuales describen las respuestas en términos generales de aceleración y reducción de ganancia de agua, respectivamente. En cuanto a la inhibición, el controlador más conocido y estudiado corresponde a la hormona Ácido Abscísico (ABA) (Zeevaart, 1991; Bewley y Black, 1994; Kermode, 2005; Bradford y Nonogaki, 2007; Bewley *et al.*, 2013). En el presente modelo de estudio, los ejes embrionales incubados en soluciones de [ABA] crecientes mostraron un progresivo retraso en la germinación (mayores t_{50} , Fig.12) asociado con %G finales decrecientes (para 0; 6,25 y 12,5 μM) a nulos (para 25; 50 y 100 μM de ABA). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió para la incubación en PEG, la dinámica de absorción hídrica bajo incubación en presencia de ABA (Fig. 13) mostró que, para todos los casos, las Fases I y II de imbibición no fueron afectadas en cuanto al tiempo y ganancia de agua en ser alcanzadas (en 2 h se completó la fase I e inició la Fase II, con un volumen promedio de 6,4 μl por eje).

Estos resultados estuvieron de acuerdo con los obtenidos por Schopfer y Plachy (1985) que indicaron que el ABA no afectó ni el potencial osmótico ni la capacidad de absorber agua durante la incubación de embriones de *Brassica napus*. Por otra parte, el efecto del ABA sobre la incubación resultó evidente en lo que respecta al inicio de la Fase III (germinación), la cual se vio retrasada en relación al control (0 μM) para las soluciones de 6,25 y 12,5 μM de ABA, tanto más cuanto mayor fue la [ABA] (Fig. 13), mientras no ocurrió para 25; 50 y 100 μM de ABA.; tal como muestran las curvas de germinación obtenidas en cada caso (Fig.12). Nuevamente y similar a lo ocurrido para la incubación en -1 MPa de PEG, los ejes embrionales de soja que permanecieron inhibidos de germinar durante 24 h en 50 μM de ABA, recuperaron su capacidad de absorber agua y consecuentemente germinar, al ser transferidos e incubados en agua destilada (Fig. 14). Sin embargo, el tiempo requerido para el reinicio de la ganancia de agua luego de la transferencia fue 4 veces superior (12 h) comparado al observado en PEG (3 h). Analizados en conjunto, estos resultados mostraron que tanto las soluciones de PEG como de ABA afectaron negativamente la germinación de ejes embrionales de soja, restringiendo la ganancia de agua durante las respectivas incubaciones, en tanto indican que mecanismos diferentes operan en cada caso. Por un lado, las soluciones de PEG restringieron osmóticamente la disponibilidad de agua necesaria para visualizar la germinación, respondiendo rápidamente a la expansión frente al aumento importante del Ψ_a luego de la transferencia a agua destilada. Por otro lado, el ABA no ejercería un efecto directo sobre el flujo de agua, sino operaría impidiendo que las paredes celulares de las células en expansión se relajen y permitan continuar la absorción hídrica; siendo necesario un tiempo de incubación en agua mayor para activar los mecanismos responsables de revertir este bloqueo. Estos resultados refuerzan la idea que el ABA opera en el relajamiento y la expansión de la pared celular, inhibiendo consecuentemente la emergencia de la radícula durante la germinación de semillas, tal como fuera demostrado en otras especies (Da Silva *et al.*, 2008; Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). Bajo este concepto, se planteó el interrogante de cuál es el tiempo mínimo necesario para que los componentes metabólicos responsables del debilitamiento de paredes celulares que conducen a la germinación se encuentren completamente activos o, en otras palabras, cuál es el tiempo de inhibición posible para el ABA durante la incubación. Los resultados para transferencias de incubación recíprocas entre agua y una [ABA] inhibitoria permitieron abordar indirectamente

estas cuestiones. Para el caso de la incubación inicial en ABA y transferencia a agua, independientemente del tiempo de incubación previo en ABA (1 y hasta 12 h), la germinación de los ejes embrionales ocurrió en todos los casos luego de la transferencia a agua (Fig. 17), tal como resultó para el tratamiento ABA – Agua por 24 h anteriormente descrito (Fig.14). Esto confirmó que la respuesta de inhibición a la germinación opera exclusivamente en presencia de la hormona, liberando a los ejes embrionales de tal restricción una vez que el ABA es removido del medio de incubación, poniendo en evidencia la reversibilidad del efecto inhibitorio del ABA sobre la germinación (Schopfer *et al.*, 1979; Schopfer y Plachy, 1984). Adicionalmente, se encontró que, de acuerdo a la ausencia de propiedades osmóticas para el ABA, la fase I de imbibición, que duró 2 h para el control en agua, no fue afectada por la presencia de ABA, de manera que los ejes preincubados durante 1 h en ABA alcanzaron la fase II luego de una hora de transferidos a agua (2 h de incubación total); en tanto, de la segunda hora de preincubación en adelante, los ejes se encontraban efectivamente en fase II al momento de la transferencia. Sin embargo, el tiempo de incubación total (ABA + agua) al cual se alcanzó el 50 %G en cada caso fue mayor para tiempos crecientes de preincubación en ABA. Así, los ejes con 1 h de preincubación en ABA presentaron un $t_{50} \sim 13$ h, aquellos preincubados entre 2 y 6 h demoraron, en promedio 15 h; para 7 h el t_{50} fue de 17 h, con 8 a 12 h de preincubación el t_{50} promedio fue de 22 h y para 24 h en ABA el t_{50} resultó de 36 h. Este retraso en la germinación en agua luego de tiempos de exposición a ABA crecientes indicaría que la activación metabólica de la germinación se producirá una vez que el ABA incorporado por los tejidos se reduzca (por catabolismo y/o lixiviado) a valores no inhibitorios. Este comportamiento se diferencia de lo informado por Schopfer y Plachy (1984) quienes indicaron que, tanto para *Sinapis alba* como para *Brassica napus*, el control por ABA operó simétricamente en el proceso de imbibición para transferencias recíprocas ABA - agua, exhibiendo un bajo nivel de histéresis. En nuestro caso, los ejes embrionales de soja preincubados en ABA y luego transferidos a agua destilada, exhibieron un grado de histéresis sobre la ganancia de agua que aumentó con el tiempo transcurrido en contacto con la hormona. Por otra parte, para la transferencia recíproca, agua – ABA, los resultados mostraron que, con tiempos de preincubación en agua de hasta 6 h, el ABA fue capaz de ejercer su control; inhibiendo completamente a los ejes luego de permanecer hasta 5 h en agua y reduciendo severamente la germinación (30 %G) para 6 h de preincubación en

agua. En tanto, para preincubaciones por más de 7 h, el efecto inhibitorio fue rápidamente perdido, registrándose un 70 %G luego de 7 h y 100 %G para 8 a 12 h de preincubación en agua (Fig. 15). Sería posible entonces considerar un tiempo mínimo de 6 h de preparación metabólica para llevar a cabo la germinación en ejes embrionales de soja; y definir una ventana de acción máxima para ABA, comprendida entre la quinta y sexta hora del proceso de imbibición, coincidente con la transición entre las fases II y III del mismo. La presencia de la hormona estrictamente durante este breve lapso temporal, sumado a la elevada sensibilidad que aún poseen los ejes embrionales de soja a la misma, determinan que el control por ABA sea posible. Esta condición fue la que llevó a inferir que el ABA actuaría previniendo un evento tardío durante la germinación, como es el relajamiento de la pared celular de la radícula (Bewley, 1997; Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). Hasta el presente no se conocen completamente los procesos metabólicos que son regulados por ABA para inhibir la germinación. Sin embargo, existen antecedentes en ciertas especies que contribuyen, de algún modo, al entendimiento del proceso. En el caso de semillas de *Medicago truncatula*, una especie que comparte la misma subfamilia botánica con soja, Faboideae (The Angiosperm Phylogeny Group, 2003), se determinó que el ABA inhibe la expresión de genes que codifican enzimas y proteínas estructurales de la biosíntesis y modificación de la arquitectura de pared celular responsables de la germinación (Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). Una situación análoga fue oportunamente informada para semillas germinadas de *Arabidopsis thaliana*, estableciéndose además que la expansión que da lugar a la germinación en estas semillas está confinada a una región discreta de los ejes embrionales inmediatamente proximal a la radícula, ubicada entre la zona inferior del hipocótilo y la zona de transición hipocótilo-radícula (Sliwinska *et al.*, 2009). Las células de esta región, denominada Zona de Elongación (ZE), o más concretamente, sus paredes celulares, constituirían blancos directos de los eventos expansivos que definen el alargamiento del eje embrional y la consecuente protrusión radicular en las semillas enteras. En el caso particular de soja, los ejes embrionales admitieron la localización macroscópica de la correspondiente ZE, tal como se observa en la Figura 19. Luego de 12 h de incubación, el crecimiento general (~ 2 mm) de los ejes definió el sentido longitudinal del mismo; en tanto, el mayor distanciamiento entre la tercera y cuarta marca (considerada desde el extremo plumular) respecto a las demás marcas permitió ubicar la ZE en los dos tercios inferiores del hipocótilo, por encima del

meristema radicular. A diferencia del crecimiento isotrópico que resultaría como consecuencia de una deposición desordenada y al azar de hebras, la orientación y el orden determinado que poseen las microfibrillas de celulosa en las paredes celulares vegetales son responsables de este crecimiento anisotrópico. Adicionalmente, tratándose de un proceso hidrostáticamente conducido, los análisis *in sílico* para tomas radiográficas de estos ejes durante la incubación confirmaron la mayor concentración de agua en la correspondiente ZE de los ejes una vez germinados (Fig. 20). De acuerdo a este criterio, la ganancia de agua que se produce durante las fases I y II de imbibición está determinada por la elasticidad de las paredes celulares del eje embrional (y/o de la semilla en su totalidad), en tanto que el inicio de la fase III (germinación en sentido estricto) depende de cambios plásticos en dichas paredes y es atributo de las células del eje embrional que corresponden a la ZE. Técnicas más modernas para medir niveles de hidratación en semillas coinciden con estos resultados en soja. Así, los análisis de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) en semillas de tabaco demostraron que, durante la absorción hídrica, la distribución de agua no es homogénea, y los tejidos de la semilla difieren en sus isotermas de absorción hídrica, siendo la radícula junto con el endosperma micropilar (involucrado en el control de la germinación de estas semillas) los tejidos seminales que presentaron los mayores niveles de hidratación (Manz, *et al.*, 2005). Más aún, las determinaciones tanto a nivel de estructura, como indirectas en cuanto al ingreso de agua al interior de las células en la ZE, quedaron firmemente demostradas en el presente trabajo a partir de las observaciones microscópicas de las células comprendidas específicamente en dicha zona para ejes embrionales en dos momentos; previo a la incubación y una vez germinados. Independientemente de si el eje embrional observado a cada momento fue diferente, tal como condiciona metodológicamente la microscopía óptica (Fig. 21) o el mismo, como permiten las técnicas *in vivo* de microscopía confocal (Figs. 24 y 25); y electrónica (Fig. 26), las células de la ZE presentaron aumentos longitudinales de tamaño promedio de 2 a 3 veces luego de germinar. En semillas de *Arabidopsis thaliana* (Sliwinska *et al.*, 2009), debido a su pequeño tamaño, no sólo fue posible una detallada descripción del crecimiento anisotrópico de las células en la ZE respecto a aquellas a ambos extremos del eje embrional, sino también, las células de dicha zona pudieron ser cuantificadas, confirmando un número constante de las mismas durante el transcurso de la incubación. De manera similar, semillas de *Medicago truncatula*

(Gimeno-Gilles *et al.*, 2009) fueron capaces de germinar en presencia de Orizalina, la cual inhibe la mitosis celular, reforzando el concepto que la germinación de semillas es un proceso netamente expansivo que ocurre previo a la división celular.

Debilitamiento de pared celular y expansión.

Tal como avalan los antecedentes previamente descritos, la naturaleza expansiva de la germinación de semillas no es producto de un incremento en el número de células del tejido en crecimiento, sino de un aumento asimétrico en el tamaño de las mismas, el cual permite que el eje embrional se alargue y consecuentemente de lugar a la emergencia de la radícula a través de la envoltura seminal. Se indicó además que este alargamiento del eje embrional está acotado a la ZE del mismo. Durante la imbibición, el ingreso de agua a las células de la ZE implica cambios de turgencia celular en las mismas. Así, a través de las Fases I y II, estas células alcanzan su máxima turgencia en equilibrio con el medio, siendo necesario un cambio irreversible en sus paredes celulares para iniciar la fase III. Es por lo tanto un prerequisite que las paredes celulares de las células de la ZE experimenten un cambio plástico que facilite un nuevo flujo de agua al interior celular. Los resultados obtenidos para la incubación de ejes embrionales de soja en solución buffer pH8 (Fig. 27) confirmaron estos conceptos, mostrando que las fases I y II, las cuales dependen de la elasticidad de la pared celular, no se vieron alteradas respecto al control en agua destilada, en tanto, el cambio plástico al cual hace referencia el crecimiento ácido de las paredes celulares (Cosgrove, 2000) no fue posible bajo las condiciones de incubación alcalinas, permaneciendo los ejes en fase II hasta el final de la incubación. Por otra parte, luego de la transferencia e incubación de estos ejes inhibidos a las condiciones de incubación del control (agua destilada), se restableció la ganancia de agua, iniciándose la Fase III una vez transcurridas 12 h de incubación. Este resultado fue coincidente con lo encontrado para la transferencia ABA - agua; indicando que, similarmente al ABA y a diferencia de lo ocurrido en PEG, la inhibición de la germinación por pH8 respondería a cuestiones metabólicas que operan sobre las paredes de las células en la ZE. Sería luego lógico suponer para esta condición un efecto inhibitorio sobre el crecimiento ácido de estas paredes, particularmente sobre la/s proteína/s Expansina/s, cuya acción debilitadora de pared es óptima a pH~ 4 y es considerada como iniciadora de la remodelación de paredes celulares (Cosgrove, 2000). Por otra parte, podría sugerirse a este mecanismo de

acción, o más específicamente a la actividad Expansina, como el blanco de control por ABA en su rol inhibitorio de la germinación. En este sentido, si bien es ampliamente aceptado que las proteínas Expansinas son un regulador clave de la extensión celular durante todos los procesos que implican crecimiento en vegetales, la relación entre las Expansinas y las hormonas vegetales aún no es clara. En diferentes especies y procesos metabólicos se han indicado tanto efectos estimulatorios (Zhao *et al.*, 2012), como represores (Bellin *et al.*, 2009) del ABA sobre la expresión de estas proteínas. En particular, Gimeno-Gilles *et al.* (2009) identificaron en *Medicago truncatula* una Expansina que participa de la germinación de estas semillas y es regulada negativamente por ABA. Dada la proximidad taxonómica entre especies, esta secuencia fue utilizada en este trabajo como uno de los puntos de inicio para la búsqueda e identificación de Expansinas de germinación en soja. Adicionalmente, el árbol filogenético (Fig. 28) contemplando esta secuencia, las Expansinas de *Arabidopsis thaliana* y las proteínas Expansinas de soja identificadas al momento permitió definir la estrategia de diseño de cebadores (Tabla 2) para la obtención de la/s putativa/s Expansina/s de soja vinculada/s a la germinación de sus semillas. El aislamiento de una secuencia a partir de ADN genómico (~1200 pb, Fig. 29) confirmó la validez para uno de los pares de cebadores previamente diseñados, al tiempo que indicó la presencia de un producto amplificable que pudiera corresponderse con la secuencia objetivo. Posteriormente, el aislamiento de un producto amplificado a partir de ADNc (~900 pb) proveniente del ARNm de células de la ZE de ejes embrionales de soja una vez germinados permitió indicar además que esta secuencia forma parte de los transcritos expresados durante la germinación de semillas de soja. Finalmente, la secuencia identificada (EXPA1-like; Fig. 30) y analizada a partir de herramientas bioinformáticas confirmó que el fragmento aislado presentó absoluta homología (100 % de cobertura, 100% de identidad, E value= 0,0) con la Expansina 1 (EXP1) identificada y caracterizada como de expresión exclusiva de raíces de plántulas de soja en crecimiento (Lee *et al.*, 2003), con identidades y/o coberturas altas con Expansinas 1 identificadas en diferentes cultivares de soja, y otros productos predichos o desconocidos, caracterizados como Expansinas putativas (Fig. 31). Un estudio reciente sobre la familia de Expansinas de soja (Zhu *et al.*, 2014) identificó, caracterizó y clasificó un total de 75 proteínas Expansinas en esta especie. El análisis filogenético para las secuencias codificantes correspondientes a estas 75 proteínas e incluyendo nuestro

transcripto recientemente aislado, ubicó a EXPA1-like en una rama del árbol para la cual una única Expansina fue clasificada. Esta Expansina, cuyo gen fue identificado por Zhu *et al.* (2014) como *GmEXPA37* (Glyma17g37990) fue referida por los mismos autores a la EXP 1 previamente descrita (Lee *et al.*, 2003). La nomenclatura más reciente para esta misma secuencia obedece a su ubicación en el genoma de soja, indicando que ésta se encuentra dentro del cromosoma 17, en el cual se localizaron además la mayoría de las restantes Expansinas de la especie (Zhu *et al.*, 2014). Cabe remarcar que la secuencia EXPA1-like obtenida abarcó ~70% de la secuencia codificante completa correspondiente a EXP1 (Glyma17g37990), la cual no incluyó el codón de inicio (ATG) para la síntesis de la proteína. Sin embargo, el alineamiento de secuencias entre el transcripto EXPA1-like y la secuencia genómica de EXP1 mostró que los tres exones están incluidos en la primera, de igual modo que los dominios conservados característicos de estas proteínas (Fig. 32).

Análisis de EXPA1-like en ejes embrionales de soja maduros y secos.

Los análisis semicuantitativos por RT-PCR para el transcripto EXPA1-like expresado en ejes embrionales de soja sometidos a distintas condiciones de incubación permitieron abordar de manera preliminar resultados previamente observados y reafirmar hipótesis derivadas de los mismos. En primer lugar, para la incubación en agua destilada (Fig. 33, calles 3 y 5), la mayor intensidad de banda del transcripto en la ZE de los ejes embrionales respecto a aquella que incluyó a ambos extremos (E, plúmula + radícula; Fig. 33, calle 7) refuerza el concepto que la expansión celular durante la germinación está confinada a dicha zona. La presencia de banda en la fracción correspondiente a los E podría deberse tanto a una menor expresión del transcripto en las células que los componen o bien, a un nivel residual de expresión de células pertenecientes a la ZE que permanecieron en uno o ambos extremos luego de la disección de los ejes embrionales. En segundo lugar, la ausencia o baja intensidad de banda para la incubación en ABA (Fig. 33, calles 4 y 6; Fig. 34, calles 10 a 12) reafirmó el rol postulado para el mismo sobre el metabolismo de paredes celulares, impidiendo el relajamiento necesario para dar inicio a la fase III de imbibición y determinando en consecuencia, la permanencia de los ejes en fase II en tanto el ABA esté presente. Otro resultado remarcable surge de la incubación en solución de PEG de $\Psi_a = -1$ MPa (Fig. 34, calles 13 a 16), donde la mayor intensidad

de banda en el transcurso de la incubación reveló la acumulación del transcripto a pesar de no concretarse la germinación, la cual, tal como se indicó previamente, no fue posible dada la baja disponibilidad de agua libre en el medio de incubación. Más aún, estos resultados avalarían la respuesta rápida a la germinación de estos ejes luego de ser transferidos e incubados en agua destilada (Fig. 11), comportamiento que podría ser explicado a partir de la cantidad de transcriptos sintetizados y acumulados que estarían disponibles para permitir la relajación de las paredes celulares y generar así el potencial de crecimiento necesario para germinar. Estudios adicionales son necesarios para confirmar el momento en el cual esta relajación de paredes celulares ocurre, si durante la incubación en PEG (en cuyo caso la expansión no fue posible por la limitante hídrica para tal estímulo) y/o, luego de la transferencia e incubación en agua destilada. Una situación similar se presentó para la incubación en buffer pH8. En este caso, la inhibición de la germinación y permanencia de los ejes en fase II (Fig. 27) fue explicada en base al conocimiento (Cosgrove, 1998; Cosgrove, 2000) que estas condiciones de pH resultan subóptimas para la actividad Expansina, en tanto la ausencia de banda en los experimentos de RT-PCR (Fig. 33, calle 8) para esta condición de incubación indicó además una posible regulación negativa a nivel transcripcional, para lo cual no se conocen antecedentes. Esta respuesta, análoga a la observada para la incubación en ABA, está de acuerdo, por otra parte, con los resultados obtenidos en los respectivos experimentos de transferencia. En ambos casos, el mayor tiempo de germinación (~12 h, Figs. 14 y 27) luego de la transferencia a agua destilada, respecto al de incubación previa en PEG (3 h, Fig. 11), fue atribuido a un efecto metabólico en la remodelación de la pared celular, tal como sugiere la ausencia de banda en el gel de agarosa (Fig. 33, calle 8).

Por último, otro resultado relevante a partir de estos análisis fue la presencia de banda para el transcripto EXPA1-like en la ZE de ejes embrionales de soja maduros que no fueron sometidos a ningún tratamiento de incubación (0 h de incubación, Fig. 33, calle 2 y Fig. 34, calle 4). Esto confirmaría que el transcripto EXPA1-like forma parte del grupo de biomoléculas que se sintetiza en la semilla durante su desarrollo y permanece almacenado en el eje embrional a la madurez. Estos resultados indicarían para el ABA no sólo un control sobre EXPA1-like a nivel transcripcional, tal como demuestra la disminución de intensidad de banda en el transcurso de la incubación (Fig. 33, calles 4 y 6; Fig. 34, calles 10 a 12), sino además una posible

acción aguas abajo del ARNm para EXPA1-like, que permita explicar la inhibición de la germinación a pesar de la disponibilidad de estos transcritos remanentes previo al contacto con la hormona. Este escenario planteó, por otra parte, la posibilidad de ocurrencia de la germinación basada en la información contenida en el eje embrional previo a su activación metabólica durante la incubación. Así, la presencia de Cicloheximida en el medio de incubación, impidiendo el proceso de síntesis proteica, o de α -Amanitina, impidiendo la síntesis *de novo* de transcritos, permitieron evaluar la germinación a expensas de las proteínas y ARNm remanentes almacenados en los ejes embrionales, respectivamente. En Cicloheximida, los resultados de germinación (Fig. 35) y dinámica de imbibición (Fig. 36) fueron análogos a la situación en ABA, con fases I y II comparables al control en agua destilada y ausencia de fase III y germinación. En α -Amanitina, tanto la germinación (Fig. 35) como la dinámica de imbibición (Fig. 36) trifásica típica fueron observadas. Sin embargo, respecto al control, se registró tanto un retraso en el inicio de la germinación como un menor %G final. También hubo un retraso en el inicio de la fase III de imbibición, con una tasa de ganancia de agua considerablemente menor en adelante. Estos resultados están de acuerdo con los informados para *Arabidopsis* (Rajjou *et al.*, 2004; Sano *et al.*, 2012), mostrando que la germinación de ejes embrionales de semillas de soja, maduras y secas, dependió estrictamente de la traducción proteica, en tanto fue posible aún en ausencia de nuevos ARNm. No obstante, la síntesis de nuevos transcritos sería requerida para obtener tasas de germinación e imbibición comparables a las registradas en agua destilada. Retomando al control inhibitorio por ABA sobre la expresión de EXPA1-like, es luego posible suponer que el mismo afecte, alternativa y/o simultáneamente, tanto la síntesis y/o actividad de la proteína en sí (dada la similitud de comportamiento respecto a Cicloheximida) como la cantidad de transcripto (remanente y/o sintetizada *de novo*).

Cuantificación de EXPA1-like en ejes embrionales de soja maduros.

La relación entre el ABA y los niveles de transcripto EXPA1-like fue evaluada por RT-qPCR a partir de las incubaciones en agua destilada o 50 μ M de ABA. Cabe aclarar que los ejes embrionales de semillas de soja maduras presentan [ABA] por debajo del umbral inhibitorio, presentándose por lo tanto completamente germinados a las 12 h de incubación en agua destilada. Sin embargo, la inhibición de la

germinación por ABA pudo ser evaluada por aplicación de ABA exógeno. En agua destilada (Fig. 37), los incrementos de expresión relativos y significativos ($p < 0,05$) a partir de la tercer hora y hasta las 12 h de incubación corroboraron las observaciones previas que mostraban una mayor intensidad de banda para cada tiempo de incubación respecto al tiempo 0 h (Figs. 33 y 34). Por el contrario, la expresión de EXPA1-like en ABA (Fig. 38) resultó inferior al control para todos los tiempos, con valores significativos ($p < 0,05$) a partir de las 8 h de incubación. Adicionalmente, los análisis de expresión relativa al control sin incubación en la ZE de ejes embrionales maduros y secos incubados en agua destilada por 6 y 12 h o para incubaciones por 6 y 12 h en agua destilada seguidas por 6 horas en 50 μM de ABA (Fig. 39) mostraron que, para 6 h de incubación en agua, los niveles de transcripto resultaron significativamente incrementados ($p < 0,05$), en tanto, la presencia de ABA luego de la transferencia fue capaz de revertir este efecto, reprimiendo la expresión de EXPA1-like a niveles próximos al inicial previo a la incubación. Por el contrario, tanto para 12 h de incubación en agua como para la condición 12 h agua + 6 h ABA, los niveles de transcriptos resultaron levemente por encima y por debajo, respectivamente, del control. Estos resultados mantienen una relación directa con los análisis de germinación correspondientes a los experimentos de transferencia agua - ABA (Fig. 15) que indicaron una ventana temporal para el ABA sobre la cual su acción inhibitoria es posible. Concretamente, para 6 h de incubación en agua, los ejes embrionales se encontraban en fase II en plena activación metabólica para desarrollar su potencial expansivo e inicio de fase III, siendo aún oportuna la intervención del ABA interrumpiendo el proceso. En tanto, luego de 12 h de incubación en agua, la germinación ya está definida y la presencia de ABA en el medio pierde por completo su efecto.

Por otra parte, los ejes embrionales de 45 DDA (MF) ya han alcanzado la madurez, difiriendo respecto a los maduros y secos en que en el primer caso, los ejes no han atravesado la etapa final de deshidratación. No obstante, las $[\text{ABA}]_e$ en ambos casos resultaron similares e inferiores a la $[\text{ABA}]$ umbral de inhibición (Gosparini, 2002), por lo que, al igual que para los ejes maduros y secos, aquellos de 45 DDA requirieron del tratamiento con ABA exógeno para los análisis en relación a la expresión de EXPA1-like durante la incubación. Similarmente, las incubaciones de estos ejes embrionales por 6 o 12 h en agua destilada mostraron que la expresión de EXPA1-like relativa al control sin incubación resultó significativamente aumentada

($p < 0,05$), en tanto disminuyó significativamente ($p < 0,05$) para 6 y 12 h de incubación en ABA (Fig. 40).

Por último, las condiciones inhibitorias de la germinación de estos ejes embrionales para incubaciones tanto en solución de PEG de $\Psi_a = -1$ MPa como buffer pH8, las cuales fueron planteadas con el propósito de evaluar la naturaleza expansiva y la actividad de Expansinas involucrada en la germinación, respectivamente, indicaron además un efecto sobre la expresión del transcrito EXPA1-like. Al respecto, estudios de germinación en semillas de tomate (Chen y Bradford, 2000) indicaron niveles tanto inalterados como disminuidos para diferentes Expansinas bajo incubación en PEG; en tanto, si bien se ha establecido el crecimiento ácido como el ambiente propicio para el correcto funcionamiento de estas proteínas (Cosgrove, 2000), no se conocen antecedentes para un efecto del pH sobre la expresión de las mismas. En este trabajo, tanto el efecto inductivo durante la incubación en PEG, como la represión de la expresión de EXPA1-like para la incubación en buffer pH8, visualizadas en geles de agarosa (Figs. 33 y 34) como bandas de mayor y menor intensidad, respectivamente, en relación al correspondiente control sin incubación, fueron confirmados por experimentos de amplificación en tiempo real (RT-qPCR) referidos a este mismo control, con incrementos de expresión significativos ($p < 0,05$) a partir de las 4 h en PEG y reducciones significativas ($p < 0,05$) para todos los tiempos evaluados en pH8 (Fig. 41). Estos resultados avalan la naturaleza netamente expansiva de la germinación, demostrando que es posible obtener una misma respuesta fisiológica (inhibición de la germinación) afectando cualquiera de los factores que la definan.

Germinación de ejes embrionales de soja durante el desarrollo.

Los resultados hasta aquí presentados describen aspectos fisiológicos y moleculares del proceso de germinación de ejes embrionales y semillas de soja maduras, los cuales, como se indicó previamente, no poseen restricciones intrínsecas para germinar. Por este motivo, los análisis de factores que afectan la germinación fueron basados en incubaciones en presencia del agregado exógeno del efector correspondiente. Una situación diferente ocurrió para el caso de semillas y ejes inmaduros. En éstos, una vez completada la histodiferenciación, la capacidad para germinar es baja y aumenta a medida que se avanza en el desarrollo (Gosparini *et al.*, 2007; valores de $G_{m\acute{a}x}$, Tabla 3), indicando alguna forma de regulación al

respecto. Así, para las semillas y ejes aislados de 25 a 40 DDA, los elevados niveles endógenos de ABA ([ABA]_e, Tabla 4) constituyeron la principal restricción a la germinación. Esto es evidente al comparar el retraso en el t_{50} de estas estructuras con los respectivos t_{50} de 45 DDA (Tabla 3), el cual representa el tiempo mínimo necesario para alcanzar el 50 %G cuando no existe inhibición por ABA. Por otro lado, el retraso en la germinación de las semillas respecto a los ejes embrionales de la misma edad (Fig. 42) fue atribuido a la presencia del tegumento en las semillas en desarrollo, el cual se convierte en un impedimento suplementario a la [ABA]_e, adicionando una restricción de naturaleza física a la germinación de semillas inmaduras de soja (Montechiarini *et al.*, 2015). En este sentido, los análisis de germinación utilizando ejes embrionales aislados tuvieron por objetivo evitar dicha interferencia física, enfocando el estudio de la dormición fisiológica del embrión sobre el órgano primario. Por lo tanto, para que la germinación de los ejes embrionales ocurra durante el desarrollo, es necesario un descenso de la [ABA]_e hasta alcanzar un valor umbral o crítico (Gosparini *et al.*, 2007). De acuerdo a esto, cuanto mayor fue la [ABA]_e (Tabla. 3), mayor fue la tasa de caída inicial, aunque más tiempo fue requerido para alcanzar la [ABA] crítica y germinar (Fig. 43). Teniendo en consideración los valores de [ABA]_e y retomando los resultados previos, la cuantificación de EXPA1-like en la ZE de ejes embrionales cosechados en cada una de las edades del desarrollo propuestas, permitió confirmar que la relación inversa entre el nivel de transcripto EXPA1-like y ABA exógeno fue también encontrada entre éste y el ABA endógeno ([ABA]_e). Explícitamente, la Figura 44 muestra que, el nivel de transcripto EXPA1-like relativo a 25 DDA, se incrementó significativamente ($p < 0,05$) a medida que se avanzó en el desarrollo, coincidentemente con los correspondientes valores decrecientes de [ABA]_e para cada caso. Adicionalmente, cabe resaltar la magnitud de estos incrementos para las sucesivas edades, lo que podría describir a esta relación por una alta sensibilidad de respuesta (expresión de EXPA1-like) frente a disminuciones paulatinas en la [ABA]_e. Por otra parte, las mayores velocidades de germinación para los ejes durante el desarrollo (t_{50} y $G_{máx}$, Tabla 3), asociados al menor tiempo necesario para que la [ABA]_e descienda hasta la [ABA] crítica, fueron también evaluadas para cada edad en relación a la evolución de los niveles de transcripto EXPA1-like durante la incubación en condiciones de germinación. En términos generales, para ejes embrionales de 25 a 40 DDA, los resultados de expresión de EXPA1-like relativos a

los correspondientes controles sin incubación, mostraron que la misma se incrementó significativamente para cada tiempo de incubación evaluado (Fig. 45). Comparativamente, el orden de incrementos durante la incubación fue muy superior para 25 DDA (~5 veces mayor) que para las restantes edades. Otra característica común para todas las edades fue el hecho que, los incrementos de EXPA1-like resultaron progresivos durante la incubación hasta el momento previo en que se visualizó la germinación para cada edad y a partir de lo cual se registró una disminución posterior. Una posible explicación para este resultado podría sugerir un desfasaje en términos moleculares y fisiológicos de la germinación. De manera simplificada, podría pensarse a la acción de EXPA1-like, iniciando el relajamiento de las paredes celulares durante la incubación, como un evento previo a la visualización efectiva del alargamiento celular que define la germinación en un eje embrional. El tiempo desde la presencia del transcripto hasta la obtención de la proteína madura y activa sería parte de este desfasaje. De acuerdo a ésto, el menor incremento registrado para EXPA1-like luego de completada la germinación, podría corresponder a un recambio natural del transcripto una vez cumplida su función. Tomados en conjunto, los resultados indicaron que ejes embrionales maduros de soja presentaron altos niveles de transcripto EXPA1-like, cuya expresión se incrementó durante la incubación en agua destilada precediendo al alargamiento en la ZE. A su vez, el agregado exógeno de ABA produjo una disminución en la expresión del transcripto. Por su parte, para ejes embrionales en desarrollo, los niveles del transcripto EXPA1-like resultaron bajos y se incrementaron con la edad, en coincidencia con la disminución natural de la [ABA]_e. Del mismo modo, para los ejes inmaduros en agua destilada, el nivel de EXPA1-like se incrementó en relación a la caída de la [ABA]_e durante la incubación.

CONCLUSIONES

La germinación es un proceso expansivo, definido por el ingreso de agua a los ejes embrionales y es visualizado en la semilla como la protrusión radicular a través de las envolturas seminales. Este alargamiento de los ejes embrionales es producto de cambios de turgencia originados por el debilitamiento y la relajación de las paredes celulares. El estudio morfológico, las observaciones microscópicas y por rayos X de ejes embrionales de semillas de soja incubados permitieron: **i-** identificar la zona de elongación, correspondiente a la región del hipocótilo comprendida entre aproximadamente 2 mm por debajo del extremo plumular e inmediatamente por encima de la radícula y; **ii-** caracterizar esta expansión hidrostática, evidenciando cambios asimétricos de longitud en las células de la zona de elongación que dieron lugar a un crecimiento celular dos a tres veces mayor respecto a la longitud inicial.

La dinámica de imbibición de ejes embrionales incubados en agua destilada resultó en una curva trifásica análoga a la descrita para semillas completas. La principal diferencia entre ambas curvas residió en que cada una de las fases fueron de menor duración y magnitud de ganancia de agua, dadas las diferentes estructuras implicadas en la imbibición para cada caso. Adicionalmente, dos tipos de controles fueron analizados regulando el flujo de agua y consecuentemente la germinación. Por un lado, la incubación de los ejes embrionales en soluciones de Polietilenglicol 8000 (PEG) permitió evaluar el control de la germinación limitando la disponibilidad de agua libre para la expansión celular. La dinámica de imbibición para esta situación se vio afectada, tanto por un retraso en la culminación como una disminución en la magnitud de absorción hídrica en cada una de las fases. Por otro lado, la incubación de los ejes embrionales en solución buffer pH8 o 50 μ M de ABA permitió evaluar el control de la germinación impidiendo el relajamiento de las paredes celulares necesario para llevar adelante este evento. Este tipo de control tiene en cuenta el componente metabólico a nivel de las células de la zona de elongación. En el primer caso, la inhibición estuvo dada por las condiciones de pH inadecuadas para definir el alargamiento celular, el cual es descrito como un “crecimiento ácido”. En el segundo caso, el ABA operó regulando la/s biomolécula/s responsable/s del proceso de remodelación de paredes celulares. En este sentido, las proteínas Expansinas fueron propuestas en la presente tesis como blancos de control primarios por ABA, por ser éstas las que, bajo condiciones óptimas de

actividad a pH~4, han sido indicadas como debilitadoras iniciales de las paredes celulares vegetales. Por este mismo motivo, el mecanismo de control por ABA fue sugerido en las etapas iniciales (ARNm) de la expresión de estas proteínas.

La estrategia molecular de trabajo permitió el aislamiento de una secuencia denominada EXPA1-like. Los análisis bioinformáticos para el transcripto EXPA1-like mostraron una alta correspondencia para el mismo con proteínas Expansinas, tanto de soja como de otras especies. Adicionalmente, la mayor homología dentro de la especie ocurrió para EXP1 (Glyma17g37990), identificada específicamente en raíces en elongación de plántulas. Los análisis de expresión de EXPA1-like en condiciones de germinación y para incubaciones en presencia de diferentes inhibidores de germinación, permitieron establecer evidencias experimentales correlativas tanto para el involucramiento de EXPA1-like durante la germinación en soja como para la relación entre EXPA1-like y el/los efector/es que reprimen este proceso.

Para las condiciones de incubación control (agua destilada) o ABA inhibitorio, los niveles de EXPA1-like en la zona de elongación de ejes embrionales maduros resultaron incrementados y disminuidos, respectivamente. Estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de trabajo, indicando que la activación metabólica de los mecanismos implicados en la remodelación de las paredes celulares, o más concretamente, la participación de proteínas Expansinas, sería un requisito primario para que la germinación ocurra. Por otro lado, confirmaría el rol inhibitorio del ABA afectando negativamente la expresión de EXPA1-like y por ende, los eventos decisivos de la expansión durante la germinación.

Una ventana temporal de acción del ABA sobre la germinación, alrededor de la sexta hora de incubación, también fue asignada a partir de los resultados de germinación para ejes embrionales incubados inicialmente en agua destilada y finalmente en ABA. Estos estudios indicaron que aún luego de 5 h de imbibición inicial en agua, el ABA fue capaz de impedir la germinación de los ejes embrionales, reduciendo su efecto inhibitorio a partir de las 6 h de incubación previa en agua. Paralelamente, los análisis de expresión de EXPA1-like para estas condiciones de transferencia mostraron que el ABA fue capaz de reprimir a EXPA1-like luego de 6 h de incubación inicial en agua, careciendo de efecto luego de una incubación previa por 12 h en agua.

Para la incubación en PEG o buffer pH8, las condiciones inhibitorias de germinación exploraron la limitación hídrica a la expansión y las condiciones subóptimas para el crecimiento ácido, respectivamente. Sin embargo, los análisis de expresión del transcripto EXPA1-like mostraron un aumento para la condición en PEG y, contrariamente, una disminución en buffer pH8. Adicionalmente, la reversión de la inhibición para ambas condiciones luego de la transferencia de los ejes embrionales a agua destilada demandó menor tiempo para aquellos provenientes de PEG que los de pH8, lo cual estaría de acuerdo con los niveles de EXPA1-like acumulados en el primer caso y reprimidos en el segundo. Estudios adicionales serán necesarios para evaluar el control de la germinación en soja por PEG o pH y su posible relación con los niveles de expresión de EXPA1-like, opuestos para ambos efectores.

Otro resultado de consideración fue la presencia de EXPA1-like expresada en la zona de elongación de ejes embrionales de soja maduros previo a la incubación, indicando la síntesis del transcripto durante el desarrollo seminal y su almacenamiento en los ejes embrionales de la semilla madura. Resultados complementarios en α -Amanitina (inhibidor de transcripción) y Cicloheximida (inhibidor de traducción) confirmaron la necesidad de síntesis *de novo* de proteínas, no así de transcriptos, para que la germinación tenga lugar. De acuerdo a esto, además de reprimir transcripcionalmente la expresión de EXPA1-like, el ABA podría estar ejerciendo algún tipo de control aguas debajo de este y otros ARNm remanentes, evitando toda posibilidad de germinación.

Las semillas de soja maduras no poseen restricciones intrínsecas para germinar, aunque resultaron inhibidas en presencia de 50 μ M de ABA. Este mismo control constituyó, por otra parte, el principal mecanismo de regulación de germinación para estas semillas durante su desarrollo, a través de los elevados niveles endógenos de ABA contenidos en el eje embrional ([ABA]_e) de las mismas. Los niveles de [ABA]_e y EXPA1-like medidos en ejes embrionales durante el desarrollo permitieron establecer además una posible relación entre ambos factores y la respuesta a la germinación. La Figura 46 muestra que las [ABA]_e medidas fueron máximas para 25 DDA y cayeron progresivamente con la edad, alcanzando niveles no inhibitorios a la madurez. Por su parte, los niveles de EXPA1-like presentaron una relación inversa a las [ABA]_e, siendo mínimos para 25 DDA y progresivamente crecientes con el

desarrollo. De acuerdo a esto, los tiempos demandados para alcanzar el 50 %G (t_{50}) fueron máximos para 25 DDA y mínimos en los ejes maduros.

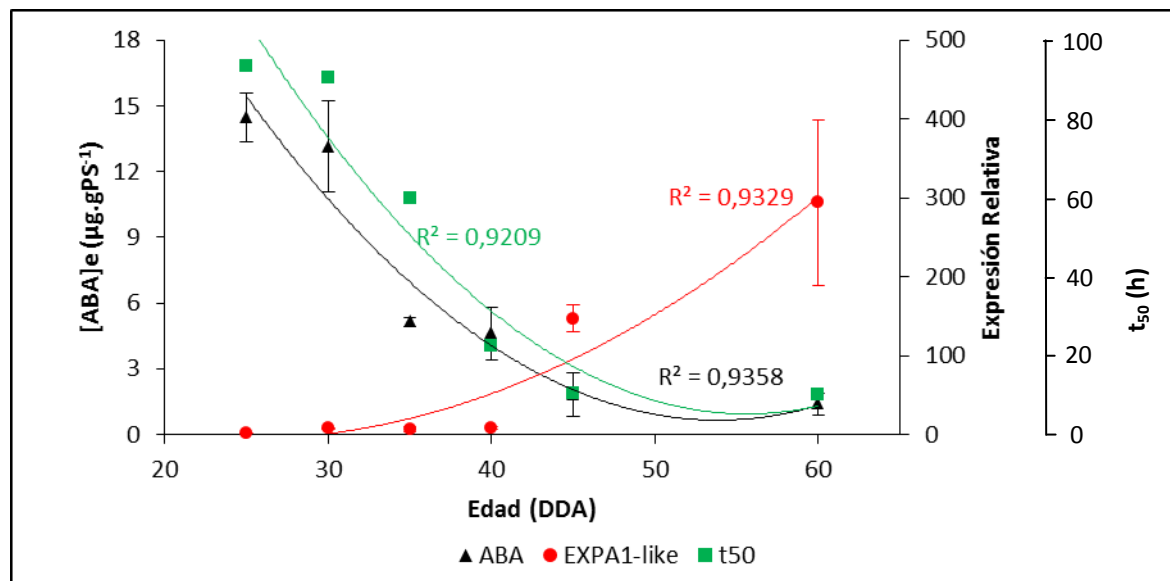


Figura 46: Relación entre la concentración de ABA del eje embrional ($[ABA]_e$), la expresión relativa de EXPA1-like y el tiempo al 50 %G (t_{50}), para ejes embrionales de soja de 25, 30, 35, 40, 45 y 60 días después de antesis (DDA). Los puntos representan el promedio \pm DE para tres réplicas de 10 estructuras cada una.

Adicionalmente, durante la incubación en agua destilada, en todos los casos las $[ABA]_e$ disminuyeron y consecuentemente la germinación ocurrió, estableciendo tasas de germinación crecientes con la edad. Similarmente, la expresión de EXPA1-like resultó incrementada para cada edad en el transcurso de la incubación en condiciones de germinación. Estos resultados estarían de acuerdo con los presentados para la condición de inhibición por ABA exógeno sobre ejes embrionales maduros, indicando que este tipo de control es posible para el ABA endógeno sobre la expresión de EXPA1-like, participando de esta manera en la regulación de la germinación de semillas de soja durante el desarrollo.

En resumen, el control de la germinación de semillas inmaduras de soja por la $[ABA]_e$ puede ser, al menos en parte explicado por un efecto sobre la expresión del transcripto EXPA1-like, con menores niveles de EXPA1-like cuanto mayor es la $[ABA]_e$. Adicionalmente, el ABA podría ejercer su control de germinación operando sobre el transcripto EXPA1-like que se sintetiza en las semillas de soja durante el desarrollo y permanece acumulado en los ejes embrionales a la madurez. Quedando demostrado que la germinación en soja es posible en ausencia de síntesis *de novo*

de transcriptos, no así de productos proteicos, un control a nivel traduccional y/o postraduccional para ABA sobre EXPA1-like sería por lo tanto también posible. Finalmente, otros compuestos que restringen la germinación en soja, tales como el PEG y el buffer pH8 mostraron tener un efecto sobre la expresión de EXPA1-like. De acuerdo a esto, el ABA podría estar controlando la germinación de semillas de soja a través de un mecanismo de acción directo y/o a través de su relación con estos u otros efectores no evaluados en esta tesis.

Los resultados producto de esta tesis constituyen una contribución valiosa al conocimiento del regulación de la expresión del programa de germinación en semillas de soja. En tanto, la profundización en el estudio del mecanismo de acción del ABA, su posible interacción con otro/s modulador/es así como la identificación de nuevos candidatos de control proponen nuevos caminos de investigación futura.

BIBLIOGRAFÍA

Ackerson, R.C. (1984a). Abscisic acid and precocious germination in soybeans. *J. Exp. Bot.* 35: 414-421.

Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., and Marion-Poll, A. (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4, pp.1–19.

Balestrini, R., Cosgrove, D.J. and Bonfante, P. (2005). Differential location of alpha-expansin proteins during the accommodation of root cells to an arbuscular mycorrhizal fungus. *Planta*, 220:889-899.

Belfield, E.J., Ruperti, B., Roberts, J.A. and McQueen-Mason, S.J. (2005). Changes in expansin activity and gene expression during ethylene promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *J Exp Bot.*, 56:817-823.

Belin, C., Megies, C., Hauserova, E. and Lopez-Molina, L. (2009). Abscisic Acid Represses Growth of the Arabidopsis Embryonic Axis after Germination by Enhancing Auxin Signaling. *The Plant Cell*, 21(8), pp.2253–2268.

Bellieny-Rabelo, D., Gamosa de Oliveira, E.A., da Silva Ribeiro, E., Pessoa Costa, E. Amâncio Oliveira, A.E. and Motta Venancio, T. (2016). Transcriptome analysis uncovers key regulatory and metabolic aspects of soybean embryonic axes during germination. *Scientific Reports*, 6, pp.1–12.

Benech-Arnold, R.L. and Rodríguez, M.V. (2018). Pre-harvest Sprouting and Grain Dormancy in *Sorghum bicolor*: What Have We Learned *Frontiers in Plant Science*; vol. 9 p. 1 – 8.

Bewley, J.D. and Black, M. (1994). Development, regulation and maturation. En: *Seeds Physiology of Development and Germination*. 2nd edition. Cap. 3, pp. 117-145. Ienum Press New York USA.

Bewley, J.D. and Downie, B. (1996). Is failure of seeds to germinate during development a dormancy related phenomenon? En: *Plant Dormancy*. Lang G.A. (Ed). Cap. 2, pp. 17-27. CAB International. New York. USA.

Bewley, J.D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*. 9 (7), pp.1055–1066.

Bewley, J.D.; Bradford, K. J.; Hilhorst, H.W.M. and Nonogaki, H. (2013). *Seeds. Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd Edition. Springer, New York USA.

Black, M. (1991). Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds. En: *Abscisic acid, physiology and biochemistry*. Davies, W. J. and Jones H.J. (Eds). Cap.8, pp 99-124. Bios Scientific Publishers Limited. Oxford, UK.

Bradford, K. and Nonogaki, H. (2007). *Seed development, Dormancy and Germination*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

Bray, E.A. and Beachy, R.N. (1985). Regulation by ABA of β -conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. *Plant Physiol*. 79: 746-750.

Brummell, D.A., Harpster, M.H., Civello, P.M., Palys, J.M., Bennett, A.B. and Dunsmuir, P. (1999). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell*, 11:2203-2216.

Burbidge, A., Grieve, T.M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, DR. and Taylor, I.B. (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *Plant Journal* 17:427–431.

Carlson, J.B. and Lersten, N.R. (1987). Reproductive morphology. En: *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*. 2nd Wilcox, J. R: (Ed). Cap.4, pp. 95-132. American Society of Agronomy Inc. Crop Science Society of America Inc. Soil Science Society of America Inc. Publishers. Madison, Wisconsin, USA.

Carpita, N.C. and Gibeaut, D.M., (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3 (1), pp.1–30.

Chen, F. and Bradford, K.J. (2000). Expression of an Expansin Is Associated with Endosperm Weakening during Tomato Seed Germination. *Plant Physiol*. Vol. 124 pp. 1265 – 1274.

Chen, F., Nonogaki, H. and Bradford, K.J. (2002). A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 367, pp. 215–223.

Cosgrove, D.J. (1998). Cell Wall Loosening by Expansins. *Plant Physiology*. 118: 333–339

Cosgrove, D.J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407 (6802), pp.321–6.

Cosgrove, D.J. (2001). Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant physiology*, 125 (1), pp.131–134.

Cosgrove, D.J. (2016). Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000 Research*, 5 (0), pp.1–13.

Da Silva, E.A.A., Toorop, P.E., Van Lammeren, A.A.M. and Hilhorst, H.W.M. (2008). ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* “Rubi”) seed germination. *Annals of Botany*, 102 (3), pp.425–433.

Darley, CP., Forrester, A.M. and McQueen-Mason, S.J. (2001). The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Molecular Biology* 47: 179–195.

Dinkova, T.D., Marquez-Velazquez, N.A., Aguilar, R., Lazaro-Mixteco, P.E. and de Jimenez, E.S. (2011). Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Science Research* 21: 85–93.

Doebley, J.F., Gaut, B.S. and Smith, B.D. (2006). The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, 127 (7), pp.1309–1321.

Dotto, M.C., Martínez, G.A. & Civello, P.M. (2006). Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. , 44, pp.301–307.

Eisemberg, A.J. and Mascarenhas, J.P. (1985). Abscisic acid and the regulation of synthesis of specific seed proteins and their messenger RNAs during culture of soybean embryos. *Planta* 166: 505-514.

Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. and Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* 59, 387–415.

Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.-Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L. and Zhu, J.-K. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*, 462, 660– 664.

Gimeno-Gilles, C., Lelievre, E., Viaua, L., Malik-Ghulama, M., Ricoulta, C., Niebelb, A., Leducc, N. and Limamia, A.M. (2009). ABA-Mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Molecular Plant*, 2 (1), pp.108–119.

Giordano, W. and Hirsch, A.M. (2004). The expression of MaEXP1, a *Melilotus alba* expansin gene, is upregulated during the sweetclover-*Sinorhizobium meliloti* interaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 17:613-622.

Gosparini, C.O. y Morandi, E.N. (1991). Utilización de efectores físico-químicos para inducir la germinación de embriones inmaduros de soja. *Evolución. Primera Reunión Nacional de Oleaginosos*. pp. 132-136. Bolsa de Comercio de Rosario.

Gosparini, C.O., Morandi, E.N y Cairo, C.A. (1997). Efecto de la edad, el lavado y la temperatura sobre la germinación de las semillas inmaduras, el crecimiento radicular y el tiempo hasta la floración, de la soja. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 102:1-9.

Gosparini, C.O. (2002) Regulación del desarrollo embrional en soja: Rol del ABA en el control de la germinación de semillas inmaduras de soja. Tesis Doctoral, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Gosparini, C.O., Busilacchi, H.A., Vernieri, P. and Morandi, E.N. (2007). Endogenous abscisic acid and precocious germination of developing soybean seeds. *Seed Science Research*, pp.165– 174.

Graeber, K., Linkies, A., Müller, K., Wunchova, A., Rott, A. and Leubner-Metzger, G. (2010). Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes. *Plant Mol Biol* 73:67–87.

Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G., Soppe, W.J.J. (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environ* 35: 1769-1786.

Gray-Mitsumune, M., Mellerowicz, E.J., Abe, H., Schrader, J., Winzell, A., Sterky, F., Blomqvist, K., McQueen-Mason, S., Teeri, T. T. and Sundberg, B. (2004). Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup a of the alpha-expansin gene family. *Plant Physiology*, 135:1552-1564.

Halmer, P. (2004). Methods to Improve Seed Performance in the Field. pp 125 – 156. In: *Handbook of Seed Physiology Applications in Agriculture*. Roberto L. Benech-Arnold, R.L. and Sánchez, R.A. (Eds) Food Products Press -The Haworth Reference Press Imprints.

Han, C., Yin, X., He, D. and Yang, P. (2013). Analysis of Proteome Profile in Germinating Soybean Seed, and Its Comparison with Rice Showing the Styles of Reserves Mobilization in Different Crops. *PLoS ONE*, 8 (2).

Howell, K.A., Millar, A.H. and Whelan, J. (2006). Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with pro-mitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus. *Plant Mol Biol* 60: 201–223.

Howell, K.A., Narsai, R.; Carroll, A., Ivanova, A., Lohse, M., Usadel, B.A., Harvey Millar, H. and Whelan, J. (2009). Mapping Metabolic and Transcript Temporal Switches during Germination in Rice Highlights Specific Transcription Factors and the Role of RNA Instability in the Germination Process. *Plant Physiology*, Vol. 149, pp. 961–980.

Hu, B., Wang, X., Liu, X., Guo, D. and Li, L. (2010). Abscisic acid (ABA)-mediated inhibition of seed germination involves a positive feedback regulation of ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. *Journal of Biotechnology*, 9 (11), pp.1578–1586.

Ishibashi, Y., Koda, Y., Zheng, S., Yuasa, T.1 and Iwaya-Inoue, M. (2012). Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. *Annals of Botany*, 111 (1), pp.95–102.

Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente- Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. and Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 7, 106-111.

Jang, S.J., Sato, M., Sato, K., Jitsuyama, Y., Fujino, K., Mori, H., Takahashi, R., Benitez, E., Liu, B., Yamada, T. & Abe, J. (2015). A Single-Nucleotide Polymorphism in an Endo-1,4- β -Glucanase Gene Controls Seed Coat Permeability in Soybean. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal. pp 1-19.

Jones, L. and McQueen-Mason, S. (2004). A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Lett*, 559:61-65.

Karssen, C.M., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C., Breekland, A.E. and Koornneef, M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous Abscisic acid: Studies on Abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 157: 158-165.

Karssen, C.M. (1995). Hormonal regulation of seed development, dormancy and germination studies by genetic control. In Kigel, J. and Galili, G. (Eds) *Seed development and germination* (pp 330-350). New York: Marcel Dekker Inc.

Kende, H., Bradford, K.J, Brummell, D.A., Cho, H., Cosgrove, D.J., Fleming, A.J., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S., Rose, J.K.C. and Voeseckel, L.A.C.J. (2004). Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Molecular Biology*, 55 (3), pp.311–314.

Kermode, A.R. (2005). Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, pp.319–344.

Kumudini, S. (2010). Soybean Growth and Development. En *The soybean. Botany, production and uses*. pp 48-73, Singh, G (Ed.), CABI Oxfordshire. UK.

Lee, D-K., Ahn, J.H., Song, S-K., Choi, Y.D. and Lee, J.S. (2003). Expression of an Expansin Gene Is Correlated with Root Elongation in Soybean. *Plant Physiology*, 131 (3), pp.985–997.

Leung, J. and Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199-222.

Li, Q., Fan, C-M., Zhang, X-M. and Yong-Fu, F. (2012). Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds. *Plant Cell Rep.* 31:1789–1798.

Lippmann, B. and Lippmann, G. (1993). Soybean embryo culture: Factors Influencing plant recovery from isolated embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 83-90.

Liu, X. and Hou, X. (2018). Antagonistic Regulation of ABA and GA in Metabolism and Signaling Pathways. *Frontiers in Plant Science*, 9, pp.1–7.

Macovei, A., Balestrazzi, A., Confalonieri, M., Fae, M. and Carbonera, D. (2011). New insights on the barrel medic MtOGG1 and MtFPG functions in relation to oxidative stress response in planta and during seed imbibition. *Plant Physiol Biochem* 49: 1040–1050.

Manz, B., Müller, K., Kucera, B., Volke, F. and Leubner-Metzger, G. (2005). Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology* 138: 1538–1551.

Melcher, K., Ng, L., Zhou, X.H., Soon, F.F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M., Park, S., Weiner, J.J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y., Li, J., Peterson, F.C., Jensen, D.R., Yong, E., Volkman, B.F., Cutler, S.R., Zhu, J.K. & Xu, H.E. (2009). A gate–latch–lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature*, 462(7273), pp.602–608.

Meng, Y., Chen, F., Shuai, H., Luo, X., Ding, J., Tang, S., Xu, S., Liu, J., Liu, W., Du, J., Liu, J., Yang, F., Sun, X., Yong, T., Wang, X., Feng, Y., Shu K. and Yang, W. (2016). Karrikins delay soybean seed germination by mediating abscisic acid and gibberellin biogenesis under shaded conditions. *Scientific Reports*, 6, pp.1–12.

Meurs, C., Basra, A.S., Karssen, C.M. and van Loon, L.C. (1992). Role of Abscisic acid in induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 98: 1484-1493.

Michel, B. E. (1983). Evaluation of the potential of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology* 72, 66-70.

Miles, D.F.N., TeKrony, D.M. and Egli, D.B. (1988). Changes in viability, germination, and respiration of freshly harvested soybean seed during development. *Crop Sci.* 28: 700-704.

Miyazono, K.-I., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.-J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida, T., Kodaira, K.-S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Tanokura, M. (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature*, 462, 609–614.

Montechiarini, N., Gosparini, C. y Morandi, E. (2012). Germinación de ejes y semillas de soja en desarrollo: efecto del ABA y el PEG. *Actas XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*. pp. 75.

Montechiarini, N., Perini, M., Sin, I., Martínez, G., Civello, P. M., Morandi, E. y Gosparini, C. (2015). Tegument mechanical control on immature soybean seeds germination. *ABSTRACTS BIOCELL 39 (suppl. 4)*. ISSN 1667-5746. A53.

Morandi, E.N., Schussler J.R. and Brenner, M.L. (1990). Photoperiodically induced changes in seed growth rate of soybean as related to endogenous concentrations of ABA and sucrose in seed tissues. *Ann. of Botany*. 66: 605-611.

Morandi, E.N. & Gosparini, C.O. (1991). Modificación del balance hormonal en embriones de soja para inducir su germinación precoz. *Evolución. Primera Reunión Nacional de Oleaginosos*. pp. 137-143. Bolsa de Comercio de Rosario.

Nakashima, K., Fujita, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi, K. (2006). Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including *RD29B* and *RD29A* in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, pp.51–68.

Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., Kamiya, Y. (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research* 20, 55–67.

Nambara, E. & Nonogaki, H. (2012). Seed biology in the 21st century: Perspectives and new directions. *Plant and Cell Physiology*, 53 (1), pp.1–4.

Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A.S., Rambo, R.P., Hitomi, C., Cutler, S.R., Schroeder, J.I. and Getzoff, E.D. (2009). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science*, 326, 1373–1379.

Nonogaki, H. (2006). Seed germination - The biochemical and molecular mechanisms. *Breeding Science*, 56(2), pp.93–105.

Nonogaki, H., Bassel, G.W. & Bewley, J.D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science*, 179(6), pp.574–581.

Nonogaki, H. (2014). Seed dormancy and germination emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science*, 5: 1–14.

Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T. and Nambara, E. (2006). CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8-O-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination. in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141, pp.97–107.

Park, S., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., Alfred, S.-E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P, Zhu, J., Schroeder, J.I., Volkman, V.F. and Cutler, S.R. (2010). Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. *Science*, 324 (5930), pp.1068–1071.

Paulsen, T.R., Colville, L., Kranner, I., Daws, M.I., Högestedt, G., Vandvik, V. & Thompson K. (2013). Physical dormancy in seeds: A game of hide and seek? *New Phytologist*, 198 (2), pp.496–503.

Pezzotti, M., Feron, R. and Mariani, C. (2002). Pollination modulates expression of the PPAL gene, a pistil-specific beta-expansin. *Plant Mol Biol*, 49:187-197.

Pinfield-Wells, H., Rylott, E.L., Gilday, A.D., Graham, S., Job, K. and Graham, I.A. (2005). Sucrose rescues seedling establishment but not germination of *Arabidopsis* mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism. *The Plant Journal* 43: 861–872.

- Puntarulo, S., Sánchez, R. and Boveris, A. (1988). Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant physiology*, 86 (2), pp.626–630.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. and Grill, E. (2010). ABA perception and signaling. *Trends in Plant Science* 15 395–401.
- Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C. and Job, D. (2004). The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology*, 134 (4):1598-1613.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C. and Job, D. (2012). Seed germination and vigor. *Annu Rev Plant Biol* 63: 507–533.
- Robichaud, C., Wong, J. and Sussex, I. (1980). Control of in vitro growth of viviparous embryo mutants of maize by Abscisic acid. *Dev. Genet.* 1: 325-330.
- Rodríguez-Gacio, M.D.C., Matilla-Vázquez, M.A and Matilla, A.J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant signaling & behavior*, 4 (11), pp.1035–1049.
- Roumet P. and Morin F. (1997). Germination of immature soybean seeds to shorten reproductive cycle duration. *Crop Sci.* 37: 521-525.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.*, 132:365-86.
- Saghai-Maroo, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci.*, 81:8014–8019.
- Sakamoto, S., Abe, J., Kanazawa, A. and Shimamoto, Y. (2004). Marker-assisted Analysis for Soybean Hard Seededness with Isozyme and Simple Sequence Repeat Loci. *Breeding Science* 54: 133-139.
- Sampedro, J. and Cosgrove, D.J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6 (12), pp.1–11.

- Sano, N., Permana, H., Kumada, R., Shinozaki, Y., Tanabata, T., Yamada, T., Hirasawa, T. and Kanekatsu, M. (2012). Proteomic analysis of embryonic proteins synthesized from long-lived mRNAs during germination of rice seeds. *Plant and Cell Physiology*, 53 (4), pp.687–698.
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S.-Y., Jamin, M., Cutler, S.R., Rodriguez, P.L. and Marquez, J.A. (2009). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, 462, 665–668.
- Sarath, G., Hou, G., Baird, L.M. and Mitchell, R.B. (2007). Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C4-grasses. *Planta*, 226 (3), pp.697–708.
- Schopfer, P., Bajracharya, D. and Plachy, C. (1979). Control of Seed Germination by Abscisic Acid. I. TIME COURSE OF ACTION IN *Sinapis alba* L. *Plant physiology*, 64 (5), pp.822–827.
- Schopfer, P. and Plachy, C. (1984). Control of seed germination by abscisic acid. II Effect on embryo water uptake in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 76, 155-160
- Schopfer, P. and Plachy, C. (1985). Control of seed germination by Abscisic acid. III Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* 77, 676-686.
- Schussler, J.R., Brenner M.L. and Brun, W.A. (1984). Abscisic acid and Its relationship to seed filling in soybeans. *Plant Physiol.* 76: 301-306.
- Seo, M., and Koshiba, T. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science.* 7: 41-48.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G. and Yamaguchi, S. (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol. Biol.* 69, 463–472.
- Sheard, L.B. and Zheng, N. (2009). Plant biology: signal advance for abscisic acid. *Nature*, 462, 575–576.
- Sliwinska, E., Bassel, G.W. and Bewley, J.D. (2009). Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the

adjacent transition zone and lower hypocotyl. *Journal of experimental botany*, 60 (12), pp.3587–94.

Steinbrecher, T. and Leubner-Metzger, G. (2016). The biomechanics of seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 68 (4), pp.765–783.

Sussex, I.M. (1975). Growth and metabolism of the embryo and attached seedlings of the viviparous mangrove, *Rhizophora mangle*. *Ann. J. Bot.* 62: 948-953.

The Angiosperm Phylogeny Group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 399–436.

Tilton V.R. and Russell S.H. (1984). *In vitro* culture of immature soybeans embryos. *J. Plant Physiol*, 115: 191-200.

Vernieri, P., Perata, P., Lorenzi, R. and Ceccarelli, N. (1989). Abscisic acid levels during early seed development in *Sechium edule* Sw. *Plant Physiology*, 91, pp.1351–1355.

Vernieri, P., Perata, P., Armellini, D., Bugnoli, M., Presentini, R., Lorenzi, R., Ceccarelli, N., Alpi, A. and Tognoni, F. (1989a). Solid phase radioimmunoassay for the quantitation of Abscisic acid in plant crude extracts using a new monoclonal antibody. *J. Plant Physiol* 134: 441-446.

Weitbrecht, K., Müller, K. & Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: Early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62 (10), pp.3289–3309.

Wolf, S., Hématy, K. and Höfte, H. (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 63, pp.381–407.

Wrobel, R.L. and Yoder, J.I. (2001). Differential RNA expression of alpha- expansin gene family members in the parasitic angiosperm *Triphysaria versicolor* (Scrophulariaceae). *Gene*, 266:85-93.

Yoshida T., Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE- dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal* 61, 672–685.

Zeevaart, J.A.D., and Creelman R.A. (1988). Metabolism and physiology of Abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 439-473.

Zeevaart, J.A.D., Rock, C.D., Fantauzzo, F., Heath T.G. and Gage D.A. (1991). Metabolism of ABA and its physiological implications. En: *Abscisic acid, physiology and biochemistry*. Davies, W. J. & Jones H.J. (Eds). Cap. 4, pp 39-51. Bios Scientific Publishers Limited. Oxford, UK.

Zhao, M., Han, Y., Feng, Y., Li, F. and Wang, W. (2012). Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. *Plant Cell Reports*, 31 (4), pp.671–685.

Zhu, Y., Wu, N., Song, W., Yin, G., Qin, Y., Yan, Y. and Hu, Y. (2014). Soybean (*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: Segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies. *BMC Plant Biology*, 14 (1), pp.1–19.