



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

## Facultad de Ciencias Agrarias

### Licenciatura en Recursos Naturales

#### **“Perfil proteómico de ejes embrionales de soja (*Glycine max* L. Merr) en condiciones propicias de la germinación”**

Alumna: Eugenia Yordán

Directora: Dra. Nidia H. Montechiarini

Co-directora: Dra. Valeria E. Perotti

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Rosario

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	5
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
El cultivo de soja	9
La semilla de soja	10
Germinación de las semillas	11
Biomoléculas de la germinación	14
Proteínas de remodelamiento de pared celular implicadas en la germinación	14
Control de la germinación por ácido abscísico	16
Justificación del modelo de trabajo	17
OBJETIVOS	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Hipótesis	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Material vegetal	20
Ensayos de germinación	20
Ensayo I: incubación de ejes embrionales en agua, PEG, ácido abscísico y cicloheximida	21
Ensayo II: incubación de ejes embrionales en ácido abscísico y PEG seguida de transferencia a agua	21
Ensayo III: ventana de tiempo de proteínas de la germinación	21
Identificación y caracterización del perfil proteómico de germinación de ejes embrionales de soja	22
Obtención de la zona de elongación de los ejes embrionales	22
Obtención de las fracciones proteicas	22
Extracción de proteínas en zona de elongación de ejes embrionales incubados 12 horas - Protocolo 1	22
Extracción de proteínas en zona de elongación de ejes embrionales incubados nueve horas	23
Protocolo 2) extracción secuencial de proteínas de pared celular	23
Protocolo 3) extracción de proteínas expansinas	24
Protocolo 4) extracción de proteínas de extensión de pared celular	25
Protocolo 5) extracción de proteínas totales	26
Determinación de concentración de proteínas totales	28

Análisis de las fracciones proteicas mediante SDS-PAGE	29
Identificación del perfil proteómico contenido en las fracciones proteicas	29
Análisis de las fracciones proteicas por Cromatografía Líquida seguida de Espectrometría de Masas (LC-MS)	29
Análisis de datos de Espectrometría de Masa (MS)	30
Identificación de proteínas y análisis bioinformático	31
Asignación de proteínas de soja no caracterizadas	31
Caracterización de perfiles proteómicos	31
RESULTADOS	33
Ensayos de germinación	33
Ensayo I: incubación de ejes embrionales en agua, PEG, ácido abscísico y cicloheximida	33
Ensayo II: incubación de ejes embrionales en ácido abscísico y PEG seguida de transferencia a agua	36
Ensayo III: ventana de tiempo de proteínas de la germinación	37
Identificación y caracterización del perfil proteómico de germinación de ejes embrionales de soja	40
Proteínas en zona de elongación de ejes embrionales incubados 12 horas	40
Proteínas en zona de elongación de ejes embrionales incubados nueve horas	41
Selección de un protocolo de extracción proteica representativo de la naturaleza expansiva de la germinación	42
DISCUSIÓN	48
Ensayos de germinación en condiciones propicias e inhibitorias	48
Reversión a la germinación luego de inhibición en PEG o ácido abscísico	50
Tiempo de acción de proteínas mínimas de germinación: incubación de ejes embrionales aislados sometidos a transferencias recíprocas Agua - Cicloheximida	51
Identificación y caracterización del perfil proteómico de germinación de ejes embrionales de soja	52
Tiempo de definición de los eventos tempranos de germinación	52
Análisis de protocolos de extracción proteica	53
Selección del protocolo de extracción de proteínas de expansión celular	55
CONCLUSIÓN	57
BIBLIOGRAFÍA	59

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera aprovechar este espacio para agradecer a la Facultad de Ciencias Agrarias, a la Universidad Nacional de Rosario y a todos los y las docentes que me he cruzado en el camino por una educación de tan buena calidad, convirtiéndome en una persona crítica y contribuyendo a mi formación profesional como Licenciada en Recursos Naturales.

Especialmente a Nidia, Cacho y Vale, por abrirme las puertas desde el inicio, por guiarme en cada paso, por depositar la confianza en mí durante todo el proceso y por haber sido una parte fundamental en mi vida universitaria.

A mi papá y mi mamá por enseñarme a aprovechar cada oportunidad en la vida, por darme el ejemplo del trabajo y el esfuerzo, por darme la oportunidad de estudiar y la libertad para elegir y por ayudarme y apoyarme en cada paso y decisión. Y a mi hermana quien además, ha sido un ejemplo a seguir.

A mis amigas de la vida y las que me dio la facultad, por escuchar y compartir conmigo los logros y las frustraciones, empujándome siempre a seguir para adelante, por intentar ayudarme siempre, pelando semillas y acompañándome en las largas horas de ensayos.

A Nacho, por ser imprescindible en mi vida, gracias por estar presente desde los comienzos de la carrera, por ayudarme a tomar decisiones, por aconsejarme, por acompañarme en las ideas, por ser guía y sostén.

Y a todos mis compañeros y compañeras de la facultad, por los mates, las cursadas, las salidas a campo y los viajes, por compartir la pasión por la biología.

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grado centígrado
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BSA	Albúmina de suero bovino
BUSCA	Bologna Unified Subcellular Component Annotator
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cv.	Cultivar
Da	Dalton
DE	Desvío estándar
DTT	Ditiotreitol
E	Eje embrional
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FP	Fracción proteica
g	Gramo
h	Hora
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid
HR	Respuesta hipersensitiva
kDa	Kilodalton
kV	Kilovoltio
L	Litro
LC	Cromatografía líquida
m/z	Cociente masa sobre carga
mA	Miliamperio
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPa	Mega pascal
MS	Espectrometría de masas
ms	Milisegundo
nL	Nanolitro
nm	Nanómetro
P/V	Peso en volumen
PEG	Polietilenglicol 8000
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ppm	Partes por millón
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
TRIS	Trisaminometano
v	Volumen
Vf	Volumen final
x g	Gravedad
ZE	Zona de elongación

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesina fueron presentados y publicados en:

### Publicaciones

- Montechiarini NH, Quijano Á, Morandi EN, **Yordán E**, Gosparini CO. 2021. **Osmo- and hormo-priming in soybean embryonic axes**. BIOCELL 45(2): A24. ISSN 1667-5746.
- Montechiarini NH, Perotti V, Margarit E, **Yordán E**, Gosparini CO. 2021. **Proteome profile previous to soybean embryonic axes germination**. BIOCELL 45(3): A54. ISSN 1667-5746.
- **Yordán E**, Pugno Á, Collado A, Peter M, Romano L, Garelli A, Gosparini CO, Montechiarini NH. 2022. **Hormonal and osmotic control of soybean embryonic axes germination**. BIOCELL 46(3): A28. ISSN 1667-5746.

### Presentaciones y publicaciones en Congresos

- Montechiarini NH, **Yordán E**, Gosparini CO. 2020. **Germinación de ejes embrionales de soja: rol de EXP1 y su control en la ventana de tiempo de respuesta a ABA**. p. 27. XXII Congreso y XL Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Noviembre, 2020.
- Montechiarini NH, Quijano Á, Morandi EN, **Yordán E**, Gosparini CO. 2020. **Osmo y hormo priming en ejes embrionales de semillas de soja**. p. 28. XXII Congreso y XL Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Noviembre, 2020.
- Montechiarini NH, Perotti V, Margarit E, **Yordán E**, Gosparini CO. 2020. **Perfil proteómico previo a la germinación de ejes embrionales de soja**. BM54. Trabajo con obtención de mención presentado a la IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Septiembre, 2020.
- Montechiarini NH, Perotti V, Margarit E, **Yordán E**, Gosparini CO. 2020. **Perfil proteómico previo a la germinación de ejes embrionales de soja**. p. 29. XXII Congreso y XL Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Noviembre, 2020.
- **Yordán E**, Perotti V, Margarit E, Martínez M, Gosparini CO, Montechiarini NH. 2021. **Early proteome profile of soybean embryonic axes germination**. XXXIII Argentinian meeting of Plant Physiology. XXXIII. Septiembre, 2021.
- **Yordán E**, Pugno Á, Collado A, Peter M, Romano L, Garelli A, Gosparini CO, Montechiarini NH. 2021. **Control hormonal y osmótico de germinación de ejes embrionales de soja**. XXIII Congreso y XLI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. p. 126. Noviembre, 2021.
- **Yordán E**, Gosparini CO, Perotti V, Montechiarini NH. 2022. **Ventana de tiempo de síntesis y acción de las proteínas de germinación de ejes embrionales de soja**. Aceptado para su presentación y publicación en el XXIV Congreso y XLII Reunión la Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Diciembre, 2022.

## RESUMEN

La germinación de las semillas implica el reinicio del crecimiento del eje embrional. Es un proceso netamente expansivo, no implica división celular y depende de la traducción proteica. Ejes aislados de semillas de soja (E) [*Glycine max* (L. Merr)] completan la germinación a las 12 h de incubación. Dicha expansión requiere el remodelamiento de paredes celulares, y proteínas expansinas como promotoras primarias responsables. En trabajos previos se identificó el transcrito de la expansina 1 (*EXP1*) en E, cuya expresión aumentó durante la germinación y se asoció negativamente al control inhibitorio de la germinación por ácido abscísico (ABA). En el presente trabajo se evaluó la incubación de E en condiciones propicias e inhibitorias de germinación con el objetivo de profundizar el estudio de la naturaleza expansiva, su esencialidad y momento de ocurrencia. Se caracterizó el perfil proteómico durante la germinación de E. Se evaluaron cuatro protocolos de extracción proteica para evaluar eventos tempranos que definen la germinación e identificar: i- el tiempo de incubación óptimo y, ii- el protocolo de extracción más representativo. Los estudios de incubación confirmaron la necesidad de expansión celular, sugiriendo al menos seis horas de incubación para la síntesis y acción de las proteínas mínimas necesarias que completan la germinación. El perfil proteico de E incubados durante nueve horas mostró actividad celular vinculada a eventos tempranos de la germinación, en tanto evidenció un perfil preferentemente post germinativo para aquellos incubados 12 h. El protocolo de extracción de proteínas de extensión de pared celular resultó mayormente enriquecido en proteínas de remodelamiento de pared celular, permitiendo además el aislamiento de *EXP1* y otras proteínas relacionadas. Estos resultados constituyen el puntapié inicial para evaluar cuantitativamente la expresión de proteínas de acción temprana de germinación y que podrían ser diferencialmente expresadas bajo condiciones inhibitorias de la germinación por ABA.

**Palabras claves:** ácido abscísico; expansión celular; germinación; *Glycine max*; perfil proteómico.

## ABSTRACT

Seed germination implies an expansion process restarting the growth of the embryonic axis. It does not involve cell division and depends on protein translation. Isolated soybean seed axes (E) [*Glycine max* (L. Merr)] complete germination at 12 h of incubation. This expansion requires cell wall remodelling and expansin proteins as responsible primary promoters. In previous works, the transcript of expansin 1 (*EXP1*) was identified in E. Its expression increased during germination and was negatively associated with the inhibitory control of germination by abscisic acid (ABA). In the present work, the incubation of E in favourable and inhibitory conditions for germination was evaluated to further support its expansive nature, its essentiality and its time of occurrence. The proteomic profile during E germination was characterized. Four protein extraction protocols were evaluated to evaluate early events that define germination and identify: i- the optimal incubation time and, ii- the most representative extraction protocol. Incubation studies confirmed the need for cell expansion, suggesting at least six hours of incubation for the synthesis and action of the minimal proteins necessary to complete germination. The protein profile of E incubated for nine hours showed cellular activity associated with early germination events, while it showed a preferentially post-germination profile for those incubated for 12 h. The cell wall extension protein extraction protocol was mostly enriched in cell wall remodelling proteins, also allowing the isolation of *EXP1* and other related proteins. These results constitute the initial step to quantitatively evaluate the expression of germination early proteins that could be differentially expressed under inhibitory germination conditions by ABA.

**Key words:** abscisic acid; cell expansion; germination; *Glycine max*; proteomic profile.

## INTRODUCCIÓN

### El cultivo de soja

La soja [*Glycine max* (L.) Merr] es una especie de la familia de las leguminosas (Fabaceae) cultivada por sus semillas de alto valor nutricional. La composición porcentual de las reservas alimentarias en una semilla de soja es de 37% proteínas, 26% carbohidratos y 17% aceites (Bewley y Black, 1994). En la Tabla 1 se muestra la variabilidad de la composición de las reservas alimenticias de soja, en comparación con otras especies de leguminosas (maní y arveja) y cereales (cebada, trigo y avena) de gran importancia agronómica.

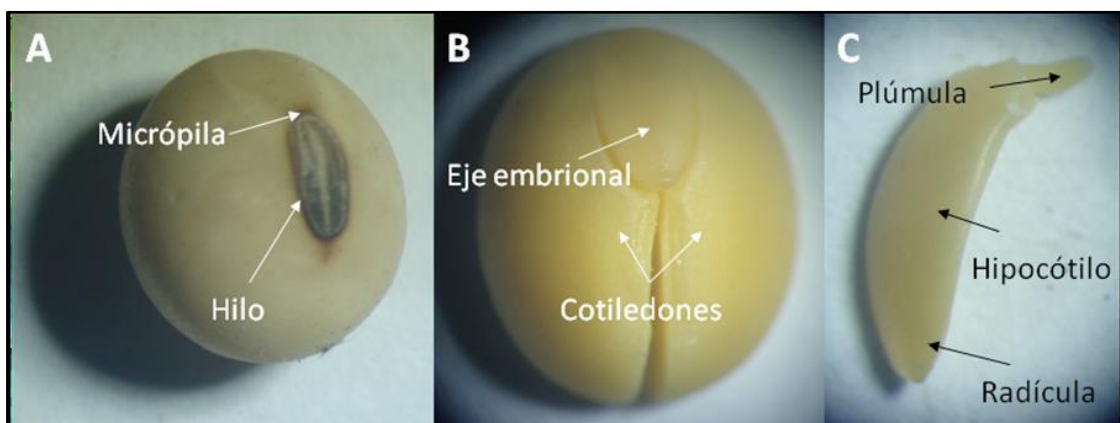
**Tabla 1.** Reserva alimentaria porcentual de especies cultivadas. Tomado de Bewley y Black (1994).

Cultivos	Proteína	Aceite	Carbohidrato
Soja	37	17	26
Maní	31	48	12
Arveja	25	6	52
Cebada	12	3	76
Trigo	12	2	75
Avena	13	8	66

Evidencias indican que la domesticación de la soja data desde el año 1.100 a. C en China del Norte (Hymowitz, 1970). Actualmente, Argentina es uno de los países líderes a nivel mundial en cuanto producción de soja, convirtiéndose en su principal rubro de exportación y siendo además el primer país exportador de harina y aceite de soja (Rodríguez Zurro y Terré, 2022). Los múltiples destinos en el mercado para el cultivo y su alta rentabilidad llevaron a un incremento drástico de superficie de soja cultivada en el país en las últimas décadas, alcanzando los 16,1 millones de hectáreas en el período 2021/22 (Bolsa de Comercio de Rosario, 2022). El grano de soja puede ser utilizado para consumo directo como fuente de alimento, aunque los procesos industriales mejoran su calidad alimenticia, favoreciendo la disponibilidad de los nutrientes y eliminando compuestos antinutritivos. Gran parte del cultivo es procesado para la producción de harinas y extracción de aceites, destinados principalmente al forraje animal y al consumo humano respectivamente, sumándose en los últimos años el uso de aceite de soja para la producción de biodiesel (Gazzoni, 1995; Organización Mundial de Conservación, 2014).

## La semilla de soja

Las semillas son la unidad de reproducción y dispersión de la mayoría de los vegetales y contienen el material genético necesario para la perpetuación de la especie (Bereke, 2018; Gutiérrez, 2020). Las semillas de soja se encuentran contenidas, normalmente de una a tres unidades, en vainas dehiscentes que las protegen y aíslan del entorno. Pueden presentar una forma esférica a levemente achatada, variando tanto en peso como tamaño (Carrao Panizzi y Gontijo Mandarino, 1995). La semilla de soja madura se compone del embrión y el tegumento seminal o episperma (Fig. 1A). El embrión consta de un eje embrional (E) y dos cotiledones de gran tamaño (Fig. 1B). A su vez, en el E se encuentra la radícula y el hipocótilo (Fig. 1C), al cual se sujetan los cotiledones y la plúmula (que dará lugar a las primeras hojas verdaderas). Debajo de la plúmula se ubica el meristema apical, a partir del cual, se originarán todas las estructuras aéreas de la futura planta (Bewley y Black, 1994). Externamente se encuentra el tegumento que protege al embrión del medio que lo rodea. En esta estructura se observa el hilo, cicatriz que se forma al desprenderse los haces vasculares que vinculan la semilla a la planta madre. En uno de los extremos del hilo está presente la micrópila, un pequeño orificio que se forma por el ingreso del tubo polínico al ovario durante el desarrollo seminal (Fig. 1A). Más tarde, en el comienzo de la germinación, este canal servirá para el ingreso de agua y la emergencia de la radícula (Leubner, 2022).



**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. Tomado de Montechiarini (2018).

La semilla de soja se clasifica como exendospermada, debido a que el endosperma es absorbido por los cotiledones durante el desarrollo de la semilla y se encuentra, por lo tanto, ausente en la semilla madura. Es por ello que los cotiledones constituyen el principal tejido

con sustancias de reserva, ocupando la mayor parte de una semilla madura y seca (Bewley y Black, 1994).

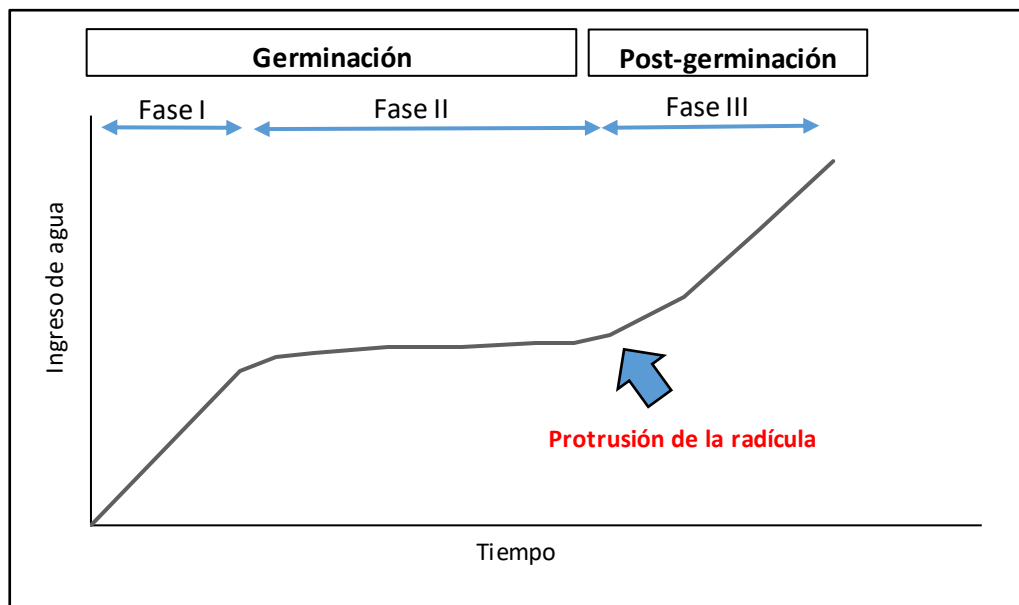
A lo largo del desarrollo de una semilla de soja, el ovario fecundado sufre una serie de cambios, pasando por varias etapas desde la formación del cigoto hasta el establecimiento de una semilla madura. La primera es la histodiferenciación, caracterizada por la formación de los tejidos de la semilla; luego viene una etapa de acumulación de sustancias de reserva en los tejidos correspondientes hasta alcanzar la madurez fisiológica. En madurez fisiológica la semilla posee aún un alto nivel de hidratación y pierde conexión vascular con la planta madre. A partir de este momento se inicia la fase de desecación, caracterizada por la pérdida de agua por deshidratación e intercambio con el medio ambiente y la adquisición de tolerancia a la desecación. En esta condición, denominada quiescencia, numerosos procesos metabólicos, como la respiración, se vuelven apenas detectables y, a diferencia de una semilla en estado de dormición, la semilla puede germinar si se dan las condiciones adecuadas (Matilla, 2008).

### **Germinación de las semillas**

La germinación es una etapa crucial en el ciclo de vida de las espermatófitas, dado que es el proceso por el cual la semilla reanuda su actividad metabólica para dar lugar a un nuevo individuo. Se esperará entonces que una semilla viva y madura contenga todas las estructuras y enzimas necesarias para reactivar su metabolismo (Matilla, 2008). En condiciones adecuadas de temperatura, oxígeno y humedad, la germinación se iniciará con el ingreso de agua a los distintos tejidos seminales. Una vez embebida totalmente la cubierta y el embrión, emergerá la radícula, generalmente a través de la micrópila (Kumudini, 2010). En términos fisiológicos, la protrusión de la radícula a través de los tegumentos es considerado el evento final que completa la germinación en sentido estricto (Bradford y Nonogaki, 2007).

Se han descrito tres fases de imbibición consecutivas para explicar la dinámica de absorción hídrica en el proceso de germinación de una semilla ortodoxa (Fig. 2). La fase I se caracteriza por el ingreso brusco de agua desde el medio de incubación hacia el interior de la semilla. Es un proceso netamente físico, conducido por la diferencia de potencial agua entre la semilla y el medio, por lo que ocurre tanto en semillas viables como no viables (Bewley y Black, 1994). Una vez iniciada la imbibición, la semilla empieza a reactivar su metabolismo, debe reparar los daños sufridos durante la desecación y rehidratación, aumentan la tasa respiratoria, la síntesis de proteínas y la síntesis y reparación de ácidos nucleicos (Bewley, 1997). Por otro lado, en la última etapa de la embriogénesis, durante el

secado de la semilla, los fosfolípidos de membrana adquieren un estado gelificado. Al embeberse las semillas, las membranas pasan de este estado de gel a uno de estructura cristalina-líquida. Este cambio de fase es tan rápido que puede provocar alteraciones temporales en la permeabilidad de las membranas y perder solutos y metabolitos de bajo peso molecular como azúcares, ácidos orgánicos, iones, aminoácidos y péptidos al medio (Matilla, 2008). En este sentido, durante la fase I de imbibición, las membranas recobran su configuración más estable y reducen la pérdida de solutos.

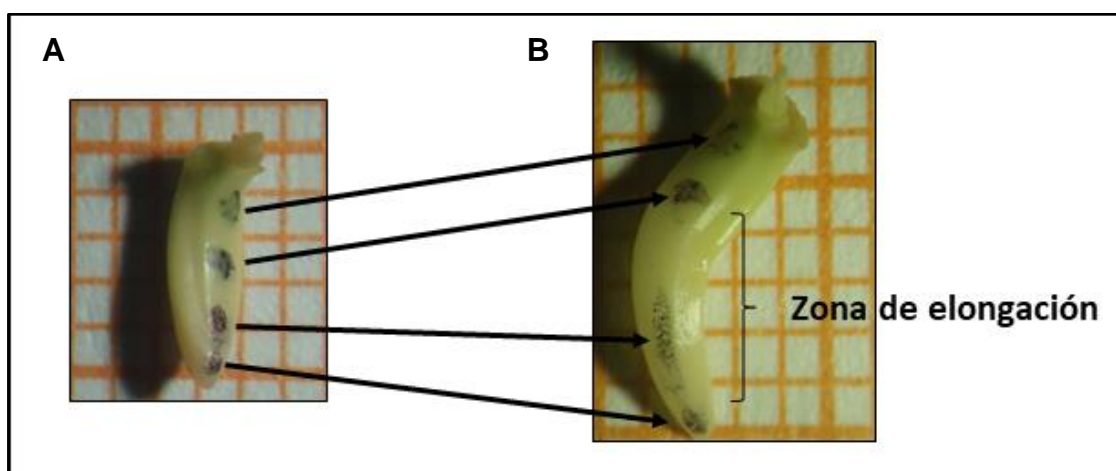


**Figura 2.** Patrón trifásico de ingreso de agua a una semilla durante la germinación.

En fase II (Fig. 2), la semilla entra en una meseta en la que el ingreso de agua se detiene o bien incrementa lentamente y se caracteriza por la digestión y movilización de sustancias de reserva menores, proveyendo tanto de energía como de precursores para la protrusión radicular y el posterior crecimiento de la plántula (Han *et al.*, 2013; Bereke, 2018). Existen dos razones por las cuales se detiene el ingreso de agua. Una de ellas es la turgencia celular, donde la presión interna generada por el ingreso de agua a la vacuola es contenida por las paredes celulares, compensando el gradiente osmótico. La segunda razón, es que las capas más externas de la semilla impiden el ingreso de agua por ser más duras, aquí la presión es contenida por las envolturas seminales. Cuando las paredes celulares logren relajarse o las capas más externas debilitarse, permitirán el ingreso de agua nuevamente a la célula (Bradford y Nonogaki, 2007; Bewley *et al.*, 2013).

Al final de la fase II (Fig. 2), la pared celular de un grupo de células de cierta región del eje embrional (Fig. 3) se debilita por el reordenamiento de sus componentes, lo que conduce a

una disminución de la presión de turgencia de la célula, la reanudación del ingreso de agua, la expansión de las células de dicha región y finalmente la protrusión de la radícula a través de las cubiertas, indicando el inicio de la fase III (Bewley 1997; Cosgrove, 1997, 2016). La tasa de ingreso de agua a la semilla es crucial en el éxito de la germinación, una absorción muy lenta o demasiado rápida podría generar daños y deterioro de la semilla, reduciendo la probabilidad de germinación (Bewley y Black, 1994).



**Figura 3.** Eje embrional de semilla de soja madura y seca marcado con tinta indeleble, **A)** previo (0 h) y **B)** luego de la incubación (12 h) en agua destilada a  $27 \pm 1$  °C y oscuridad.

La germinación de las semillas es por lo tanto un proceso netamente expansivo, siendo necesaria la división celular recién a partir de la fase III para permitir el posterior crecimiento del embrión (Bereke, 2018). La expansión celular es un proceso mecánico-hidráulico en donde la presión de turgencia ejercida sobre las paredes celulares actúa como fuerza motriz de expansión y alargamiento celular, lo cual ocurre preferentemente en la zona de transición radícula-hipocótilo, denominada "zona de elongación" (ZE; Fig. 3; Sliwinska *et al.*, 2009; Montechiarini *et al.*, 2020). La reducción de la tensión se logra principalmente mediante el debilitamiento y remodelación de la pared celular. Adicionalmente, la disminución del potencial osmótico originado por la movilización temprana de reservas menores almacenadas hacia el embrión en crecimiento (Bradford y Nonogaki, 2007) podría contribuir, permitiendo el posterior ingreso de agua y la consiguiente deformación plástica de la pared (Niklas, 1992; Cosgrove, 1993, 2014a; Schopfer, 2006; Bellieny-Rabelo *et al.*, 2016; Steinbrecher y Leubner-Metzger, 2017).

## **Biomoléculas de la germinación**

Experimentos de germinación en soja mostraron que, en presencia de un inhibidor transcripcional ( $\alpha$ -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 presencia de cicloheximida, indicando que la germinación es posible a partir de los ARNm acumulados durante el desarrollo (Montechiarini, 2018), en tanto requiere la síntesis *de novo* de las proteínas necesarias para que el proceso ocurra. Para que la germinación tenga lugar, es necesaria la activación de proteínas y enzimas que participan tanto en la elongación del E como en la movilización de sustancias de reservas. Los genes expresados tras la rehidratación de las semillas, estarían asociados a las llamadas “proteínas de mantenimiento”, necesarias para las actividades celulares básicas como respiración, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y membranas y metabolismo de aminoácidos, o bien a proteínas que participan en procesos específicos de germinación, los cuales no han sido identificados completamente hasta el momento (Bewley *et al.*, 2013; Matilla, 2008).

Una semilla madura y seca contiene una gran reserva de ARNm que han sido transcritos y acumulados durante el desarrollo de la semilla. Estos son llamados ARNm de larga vida porque han podido sobrevivir a la desecación y mantenerse activos por largos periodos de tiempo en semillas secas (Sano *et al.*, 2012). También se conservan todos los componentes necesarios para reactivar la traducción una vez iniciada la imbibición (Bewley *et al.*, 2013). Los ARNm residuales, así como el aparato traduccional son necesarios para sustentar la síntesis proteica temprana e iniciar la germinación. Tras la imbibición y hacia fines de la fase I, los ARNm residuales comienzan a traducirse para mantener las funciones básicas del metabolismo. A medida que avanza la imbibición estos son reemplazados por transcritos sintetizados *de novo*, cuya función está asociada a la germinación y crecimiento, incluidos aquellos que codifican factores de transcripción, enzimas del metabolismo hormonal, proteínas de señalización y enzimas de modificación de pared celular. Puede decirse, por lo tanto, que a medida que avanza la germinación, la síntesis proteica depende cada vez más de los nuevos ARNm sintetizados, mientras que los conservados se van agotando (Bewley *et al.*, 2013).

## **Proteínas de remodelamiento de pared celular implicadas en la germinación**

La pared celular vegetal es una matriz extracelular que determina la forma, el tamaño y le aporta rigidez a la célula. Es además una barrera permeable, que protege de patógenos y agresiones mecánicas a las células (Molist *et al.*, 2011; Megías *et al.*, 2021). Las proteínas

pueden estar adheridas a la matriz de la pared celular por medio de enlaces no covalentes como fuerzas de Van der Waals, enlaces puente hidrogeno, interacciones hidrofóbicas o enlaces iónicos. También pueden estar adheridas por medio de interacciones más fuertes como enlaces covalentes (Feiz *et al.*, 2006).

La pared celular primaria está formada por microfibrillas de celulosa encastradas en una matriz de pectinas, hemicelulosa (principalmente xiloglucano) y proteínas. Esta tiene la capacidad de extenderse limitadamente bajo presión de turgencia permitiendo el crecimiento celular (Lerouxel *et al.*, 2006; Molist *et al.*, 2011). Para que la pared celular pueda debilitarse y expandirse, las microfibrillas deben separarse por medio de un control selectivo de ablandamiento y modificación de sus uniones. A su vez, la orientación de las microfibrillas en la pared determinará la orientación de crecimiento celular, ya que generalmente ocurre en dirección perpendicular a la orientación de las mismas (Cosgrove, 2014a). Cosgrove (2014a, 2014b) propone un modelo en donde las microfibrillas de celulosa entran en contacto en pequeñas regiones llamadas “puntos calientes biomecánicos” y en ocasiones el xiloglucano actúa como pegamento conectando las microfibrillas en una red.

Unas de las principales proteínas que intervienen en el reordenamiento y debilitamiento de la pared celular y consecuentemente en la expansión son las expansinas, consideradas promotoras primarias de estos procesos de expansión celular. Aparentemente, el mecanismo de acción de las expansinas cumpliría un rol crucial debilitando los enlaces no covalentes entre las microfibrillas de celulosa, específicamente sobre los puntos calientes biomecánicos, permitiendo el movimiento de las cadenas, logrando pasar de un estado de tensión a uno de relajación y facilitando la entrada de agua y de los demás componentes moleculares y enzimas modificadoras de pared celular que completan y definen el proceso expansivo (Cosgrove 2000, 2005; 2014a, 2014b, 2016). Actúan en cuestión de segundos y bajo cantidades catalíticas, en tanto no se les ha encontrado actividad enzimática. El mecanismo no enzimático propuesto para estas proteínas sostiene que, al no afectar de manera covalente la estructura de la pared celular, no altera su plasticidad o elasticidad y por tanto su efecto sería reversible (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995; Cosgrove 1998, 2016; Sampedro y Cosgrove, 2005). También se ha demostrado que la expansión de la pared celular ocurre a un pH óptimo entre 3,5 y 4,5 (McQueen-Mason *et al.*, 1992), por lo que una extracción en medio ácido favorecería la liberación de expansinas.

Otras proteínas que intervienen en el proceso son la xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa (XTH) y la celulasa, ambas con acción enzimática. La primera hidroliza las cadenas de xiloglucano, permitiendo que luego se integren cadenas

de xiloglucano secretadas a cadenas ya existentes unidas a la pared. Este accionar permite que se formen nuevas y más largas uniones entre los xiloglucanos, reestableciendo la resistencia de la pared celular y permitiendo que las cadenas de microfibrillas se separen y que la célula se expanda (Purugganan *et al.*, 1997; Cosgrove, 2005; Fry, 2004; Miedes *et al.*, 2011). Por su parte, la celulasa actúa rompiendo sustancialmente los contactos entre las cadenas de celulosa, dando lugar a una pared más débil (Cosgrove 2005; 2014b; Cosgrove 2016).

Chivasa *et al.* (2002) identificaron proteínas expansinas, pectinesterasas y glucanasas como proteínas de pared celular en cultivo de suspensión celular de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). En *Medicago truncatula* se reportaron expansinas, xiloglucano endotransglicosilasa y pectinesterasa asociadas al relajamiento y expansión de pared celular, cuyos genes se expresaron durante la germinación (Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). En soja, se han identificado algunas de estas proteínas de remodelamiento de pared celular, las cuales operan temprano durante la imbibición, induciendo el debilitamiento y relajamiento celular necesario en las células de la zona de elongación y promoviendo así la expansión celular que define el inicio de la fase III correspondiente a la germinación en sentido estricto (Bellieny-Rabelo *et al.*, 2016; Sangi *et al.*, 2019; Montechiarini *et al.*, 2020). En particular, estudios sobre el transcripto de una expansina (*EXP1*) abundantemente expresada en dichas células, mostraron que el mismo pertenece al pool de ARNm de larga vida y resultó *up*-regulado durante la germinación (Montechiarini *et al.*, 2020). La expresión de expansina (Montechiarini *et al.*, 2020) y XTH en las primeras horas de germinación de E de soja podría contribuir al control del remodelamiento de la pared celular por medio de la disminución de la presión hidráulica (Sangi *et al.*, 2019). Estos antecedentes soportan así al proceso de expansión celular como el responsable primario de la protrusión radicular en una semilla entera o del alargamiento de un eje embrional aislado logrando así completar la germinación en términos fisiológicos (Matilla, 2008).

### **Control de la germinación por ácido abscísico**

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal encargada de regular numerosos procesos durante el ciclo de vida de una planta, incluyendo eventos claves en la formación de la semilla, como evitar la germinación precoz, permitir la síntesis y deposición de sustancias de reserva, otorgar tolerancia a la desecación e inducir a la dormición primaria (Kermode, 2005; Gosparini *et al.*, 2007; Montechiarini *et al.*, 2020; Montechiarini *et al.*, 2022).

La dormición se define como la incapacidad de una semilla viable para germinar aun cuando las condiciones sean favorables (Hilhorst, 1995). La dormición puede presentarse durante el desarrollo de la semilla, evitando la viviparidad, o bien en semillas maduras; puede estar impuesta por los tejidos que rodean al embrión y/o por factores propios del embrión (Bewley y Black, 1994; Varela y Arana, 2011). Esta característica es considerada un mecanismo que han desarrollado las plantas para asegurar la supervivencia de las futuras plántulas, restringiendo la germinación en caso que los factores ambientales sean desfavorables (Bereke, 2018). En soja, se ha demostrado que el elevado contenido de ABA en los E de estas semillas inmaduras es el responsable mayoritario de mantener al embrión en desarrollo dormido (Gosparini *et al.*, 2007; Montechiarini, 2009, 2018). Por otro lado, si bien a la madurez la semilla de soja no presenta ninguno de estos impedimentos para germinar, la incubación de las mismas bajo determinadas concentraciones de ABA exógeno inhibe la germinación mediante el control de la expansión celular (Montechiarini *et al.*, 2020). Aparentemente, el ABA operaría bloqueando el reordenamiento de la pared celular, impidiendo su debilitamiento y por lo tanto evitando la protrusión de la radícula a través de los tegumentos. Es decir, se bloquea la transición de la fase II a la fase III de la curva de imbibición, sin afectar la ocurrencia de las fases I y II (Fig. 2; Baskin y Baskin, 1998; Montechiarini, 2018; Montechiarini *et al.*, 2020). En *Medicago truncatula* genes de relajamiento y expansión de pared celular (expansinas, xiloglucano endotransglucosilasa y pectinesterasa) fueron fuertemente inhibidos en presencia de ABA (Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). En soja, el efecto inhibitorio por ABA exógeno sobre la germinación de los E maduros y secos, así como por el ABA endógeno sobre la germinación de E inmaduros se asoció a un efecto de *down*-regulación de la expresión de *EXP1* por la fitohormona (Montechiarini *et al.*, 2022). Durante el desarrollo de la semilla de soja en la planta madre, el contenido de ABA aumenta junto con la acumulación de fotoasimilados al inicio de la embriogénesis, alcanzando un pico cuando la histodiferenciación se ha completado. A partir de este punto el contenido de ABA empieza a disminuir en el E de la semilla inmadura hasta alcanzar la madurez fisiológica, quedando lista para germinar cuando las condiciones lo permitan (Schussler *et al.*, 1984; Gosparini *et al.*, 2007).

### **Justificación del modelo de trabajo**

En términos fisiológicos, la germinación de las semillas implica el reinicio del crecimiento del E como consecuencia de la expansión celular que experimentan específicamente las células de la ZE de estos E durante la imbibición en condiciones adecuadas. De acuerdo a ello, los experimentos mostrados en el presente trabajo analizaron la incubación de estos

E de soja aislados del resto de los órganos seminales que conforman la semilla completa, en tanto los estudios moleculares se enfocaron en las ZE, las cuales fueron cuidadosamente disectadas de los E incubados a los tiempos correspondientes.

La germinación de E maduros y secos de soja es posible a partir de los transcritos sintetizados en las semillas durante el desarrollo y almacenados en los E de las mismas a la madurez (Montechiarini, 2018), dentro de los cuales el grupo de trabajo ha identificado la expansina (*EXP1; Glyma17g37990*) más abundantemente expresada durante la germinación de E de soja (Beliény-Rabello *et al.*, 2016; Sangi *et al.*, 2019; Montechiarini *et al.*, 2020). Al respecto, se determinó que tanto las elevadas concentraciones de ABA en el E durante el desarrollo seminal como la adición de ABA exógeno durante la incubación de E de soja maduros y secos han bloqueado la germinación de los mismos, demostrando un efecto de *down*-regulación sobre la expresión y síntesis *de novo* del transcrito *EXP1* (Montechiarini *et al.*, 2020, 2022). Sin embargo, si la contribución a la inhibición de la germinación por ABA a través del control de *EXP1* opera exclusivamente a nivel transcripcional y/o también teniendo un efecto aguas abajo del transcrito es aún desconocido.

En este sentido, el presente proyecto pretende evaluar diferentes protocolos de extracción proteica y tiempos de incubación de E de soja con miras a la puesta a punto de las condiciones que permitan identificar y caracterizar el perfil proteómico que actúa tempranamente definiendo la germinación de E de soja. Los resultados obtenidos en esta etapa constituirán además el puntapié inicial para acciones futuras en cuanto a evaluar cuantitativamente la expresión de dichas proteínas bajo condiciones adecuadas de germinación y que podría ser además diferencialmente afectada bajo condiciones inhibitorias de la germinación por ABA.

Se espera que estos resultados contribuyan al conocimiento de los mecanismos que operan en la germinación de las semillas, resaltando la importancia de la existencia de los controles estrictos que modulan una de las etapas más cruciales en el ciclo de vida de las espermatófitas, con el objetivo de maximizar las posibilidades de éxito en el establecimiento de las mismas y garantizando así su perpetuidad.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Identificar el tiempo de incubación y protocolo de extracción proteica adecuado para caracterizar el perfil proteómico temprano durante la germinación de ejes embrionales de soja.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar la ventana de tiempo de imbibición durante la cual se sintetizan las proteínas mínimas necesarias para iniciar y llevar a cabo la germinación en E de semillas de soja.
2. Relacionar la ventana de tiempo de síntesis de proteínas mínimas de germinación con la ventana de tiempo de respuesta a ABA durante la cual la hormona fue capaz de inhibir la germinación de los E de semillas de soja y después de la cual la germinación progresó aún en su presencia.
3. Identificar el tiempo de incubación y protocolo de extracción proteica adecuado que permitan el abordaje y caracterización de las proteínas que operan en los eventos tempranos de la germinación de E de semillas de soja.

### **Hipótesis**

- Las proteínas mínimas de germinación se sintetizan temprano durante la incubación, previo a que el proceso se manifieste visiblemente completo.
- La ventana de acción del ABA coincide con el tiempo de síntesis de proteínas mínimas necesarias para que ocurra la germinación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron semillas maduras y secas de soja (*Glycine max* L. Merr) cv. Williams 82, cosechadas de plantas cultivadas en el lote asignado a la Cátedra Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCAGR-UNR), en la localidad de Zavalla, Santa Fe. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones ambientales naturales, con controles fitosanitarios necesarios y manteniendo un adecuado nivel hídrico durante todo el período de cultivo mediante riego por goteo.

Considerando que el órgano responsable de la germinación es el eje embrional (E), y que, en una semilla entera, las otras estructuras seminales retrasan el flujo hídrico hacia el E, los tiempos de inicio y duración de cada una de las fases de la curva de imbibición que definen a la germinación son más cortos para E aislados que para semillas enteras. Por lo tanto, para todos los experimentos planteados se trabajó con E aislados de semillas maduras y secas. Se procedió a la disección manual de las semillas con bisturí estéril para obtener los E, eliminando el tegumento y los cotiledones. Los E se incubaron a  $27 \pm 1$  °C y oscuridad, en placas de Petri sobre dos papeles de filtro saturados con la solución correspondiente a cada experimento, reponiendo el medio de incubación cuando fue necesario. La cantidad de E y el tiempo de incubación dependieron de las necesidades indicadas para cada experimento.

### Ensayos de germinación

Para estudiar la dinámica de imbibición de E incubados bajo condiciones propicias y restrictivas de la germinación, se realizaron ensayos en los cuales se incubaron E de soja en agua destilada estéril (control) y soluciones -1 MPa de Polietilenglicol 8000 (PEG), 100  $\mu$ M de ácido abscísico (ABA) y 100  $\mu$ M de cicloheximida. Se registró la absorción de agua de los E a diferentes tiempos de incubación de acuerdo a cada ensayo. Los E se consideraron visiblemente germinados cuando se constató un alargamiento de la radícula  $\geq 2$  mm respecto su longitud inicial. La evolución de la absorción de agua se determinó como los microlitros de agua absorbidos por eje embrional ( $\mu$ L H<sub>2</sub>O. E<sup>-1</sup>). Para ello se pesaron los E al inicio de cada tratamiento y en cada uno de los siguientes tiempos de incubación, especificados según el ensayo, secando superficialmente las muestras con papel absorbente antes de cada pesada. Se utilizó una balanza Precisa 205 A SuperBall-series, con un nivel de precisión de  $10^{-5}$  g.

### ***Ensayo I: incubación de ejes embrionales en agua, PEG, ácido abscísico y cicloheximida***

Tres réplicas de diez E cada una fueron incubadas en agua destilada estéril (control), y en soluciones -1 MPa PEG, 100  $\mu$ M de ABA y 100  $\mu$ M de cicloheximida. En todos los tratamientos, las pesadas se realizaron desde el inicio del experimento, cada una hora hasta las 13 h inclusive, dando por finalizada las incubaciones y registro de peso a las 24 h.

### ***Ensayo II: incubación de ejes embrionales en ácido abscísico y PEG seguida de transferencia a agua***

Tres réplicas de diez E cada una se incubaron en 100  $\mu$ M de ABA y -1 MPa PEG. Los E se pesaron cada una hora hasta las tres horas inclusive (momento a partir del cual se alcanzó la fase II de imbibición). A las 17 h de incubación, los E se pesaron nuevamente y se transfirieron a agua destilada estéril, continuando la imbibición en este nuevo medio. A continuación, los E se pesaron cada una hora hasta las 31 h, dando por finalizada la incubación con una última pesada a las 43 h de incubación totales. Se compararon el tiempo de inicio y la tasa de absorción de agua durante la fase III de imbibición en agua destilada luego de la transferencia desde los respectivos medios. El análisis de la tasa de absorción se realizó mediante test de ANOVA ( $p < 0,05$ ).

### ***Ensayo III: ventana de tiempo de proteínas de la germinación***

Se evaluó la ventana de tiempo de respuesta a la cicloheximida, entendida como el tiempo de síntesis de proteínas mínimas necesarias para completar la germinación de E de soja. Para ello 120 E se incubaron inicialmente en agua destilada estéril y en adelante, muestras de diez E cada una fueron transferidas consecutivamente cada una hora hasta las 12 h de incubación, a una solución 100  $\mu$ M de cicloheximida, continuando en adelante la incubación en este nuevo medio. Adicionalmente, se incubaron diez E en 100  $\mu$ M de cicloheximida (sin incubación previa en agua destilada) como control negativo de germinación y diez E en agua destilada estéril (sin transferencia a cicloheximida) como control positivo de germinación. En todos los casos, la dinámica de absorción de agua se registró a partir del momento de la transferencia a cicloheximida, en intervalos horarios hasta las 12 h, finalizando el experimento con una última pesada a las 28 h de incubación en cicloheximida.

## **Identificación y caracterización del perfil proteómico de germinación de ejes embrionales de soja**

### ***Obtención de la zona de elongación de los ejes embrionales***

Dada la naturaleza expansiva que define la germinación, la cual está confinada a las células localizadas en la zona de elongación (ZE) de los E, los mismos fueron seccionados manualmente con bisturí estéril en dos regiones, correspondientes a la ZE y los extremos (plumular y radicular). Las ZE fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a -70 °C hasta el momento de la extracción de proteínas, en tanto los extremos se descartaron.

Inicialmente, se trabajó con E de nueve y 12 h de incubación con el objetivo de identificar el perfil proteómico que describe más cabalmente los eventos tempranos que definen la germinación. En adelante, se trabajó en la selección y puesta a punto del protocolo de extracción proteica más apropiado para describir la naturaleza expansiva de la germinación. En este último caso se trabajó únicamente con E de nueve horas de incubación.

### ***Obtención de las fracciones proteicas***

De acuerdo al rol primario asignado a las proteínas de pared celular en los procesos de expansión vegetales, se evaluaron preferencialmente diferentes protocolos de extracción de proteínas de pared. Adicionalmente, se incluyó en el estudio un protocolo de extracción de proteínas totales. En todos los casos, los extractos proteicos analizados se obtuvieron a partir de las ZE de E de soja incubados en condiciones adecuadas de germinación en agua destilada.

### ***Extracción de proteínas en zona de elongación de ejes embrionales incubados 12 horas - Protocolo 1***

Se utilizó el protocolo de extracción de proteínas con cloruro de calcio propuesto por Feiz *et al.* (2006) para paredes celulares de hipocótilos de *A. thaliana*. Se colocó un gramo de tejido en un mortero frío, se añadió 0,1 g de PVP y se pulverizó con nitrógeno líquido. Se añadió 30 mL de buffer 5 mM de acetato de sodio pH 4,6 conteniendo 0,4 M de sacarosa y 1 mM de PMSF. A continuación, se incubó a 4 °C por 15 min en agitación constante, se centrifugó a 4 °C por 15 min a 1.000 x g y se descartó el sobrenadante (SN). Al precipitado se le añadió 30 mL de buffer 5 mM de acetato de sodio pH 4,6 conteniendo 0,6 M de sacarosa y 1 mM de PMSF. Se repitió el paso, pero agregando 30 mL de buffer 5 mM de acetato de sodio pH 4,6 conteniendo 1 M de sacarosa y 1 mM de PMSF; se centrifugó a 4 °C por 15 min a 1.000 x g, se descartó el SN y se lavó el precipitado con 50 mL de buffer 5 mM de acetato de sodio pH 4,6. A continuación se centrifugó a 4 °C por 15 min a 4.000 x

g, se descartó el SN y se repitió el paso de lavado y centrifugación. Por último, se añadió al precipitado un mL de buffer 5 mM de acetato de sodio pH 4,6 conteniendo 0,2 M de cloruro de calcio y 1 mM de PMSF. Se centrifugó a 4 °C por 15 min a 4.000 x g. El precipitado se descartó y el SN se conservó para el posterior análisis proteico, constituyendo la fracción proteica de 12 h (Fig. 4\*).

### ***Extracción de proteínas en zona de elongación de ejes embrionales incubados nueve horas***

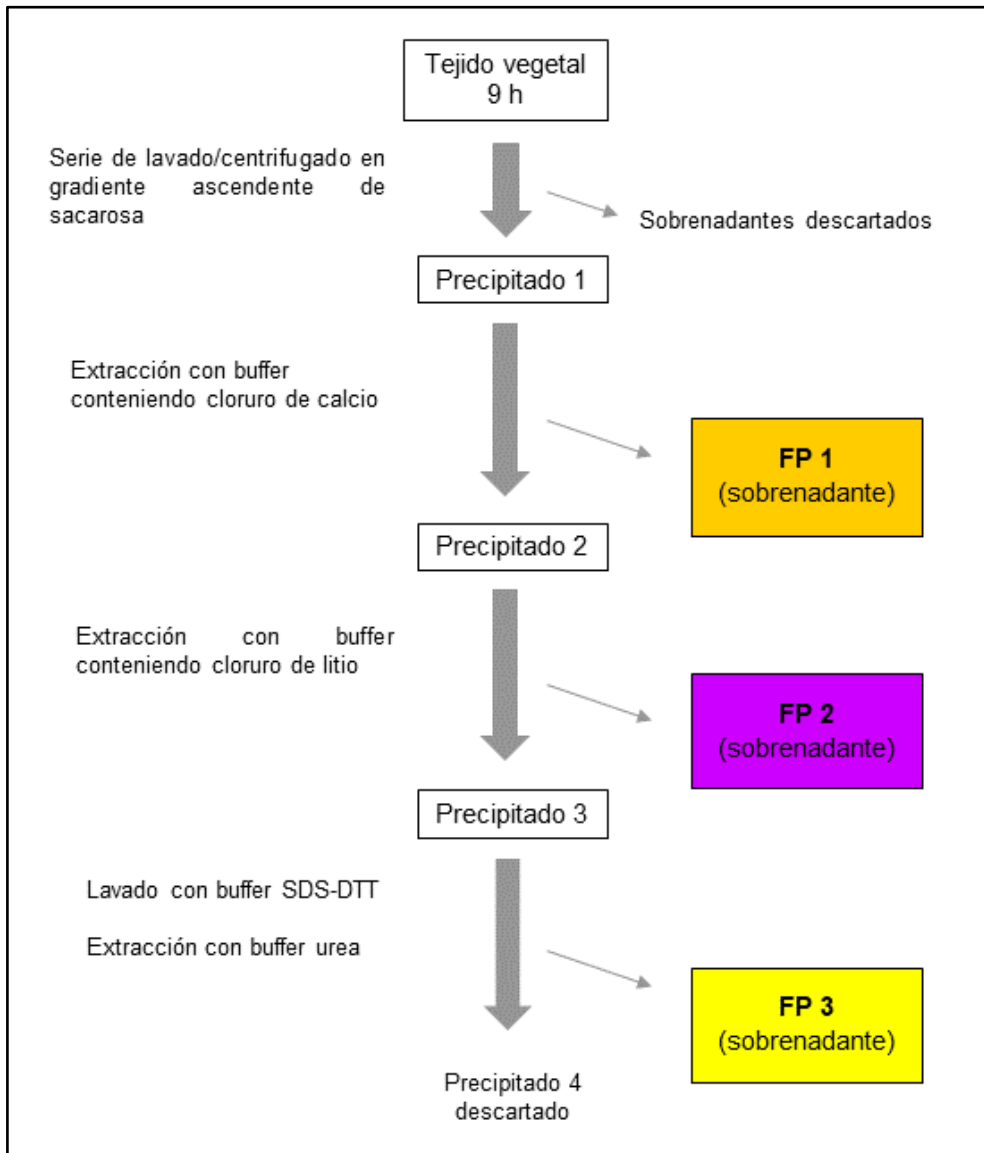
#### ***Protocolo 2) extracción secuencial de proteínas de pared celular***

Se utilizó el protocolo de extracción proteica secuencial con algunas modificaciones, propuesto para hipocótilos de *Arabidopsis*, seguido de un paso de extracción final en buffer urea propuesto para suspensión de células de *A. thaliana* en cultivo (Feiz *et al.*, 2006). Se procuró así la obtención de diferentes fracciones de proteínas de pared celular basadas en el tipo de interacción y grado de retención de las mismas a los polímeros constituyentes de pared celular.

La primera etapa de extracción implicó el mismo protocolo de extracción descrito anteriormente para los E de 12 h de incubación (protocolo 1). El SN obtenido en la última centrifugación de esta etapa se conservó para el posterior análisis proteico, constituyendo la fracción proteica 1 (FP 1; Fig. 4), mientras que el precipitado se utilizó para las extracciones subsiguientes como se detalla a continuación.

Al precipitado se le añadió un mL de buffer 5 mM de acetato de sodio pH 4,6 conteniendo 2 M de cloruro de litio y 1 mM de PMSF. Se centrifugó a 4 °C por 15 min a 4.000 x g y el SN se conservó para el posterior análisis proteico, constituyendo la fracción proteica 2 (FP 2; Fig. 4). Al precipitado se añadió a continuación un mL de buffer SDS-DTT (62,5 M Tris-HCl; pH 6,8; 4% SDS; 50 mM DTT). Se agitó y llevó a 100 °C a baño maría por diez min, seguido de centrifugación a 4.000 x g por 15 min. El SN se descartó (dado que contiene mayoritariamente proteínas citosólicas) y finalmente, al precipitado restante se le añadió un mL de buffer urea (7 M urea; 2 M tiourea; 4% CHAPS; 1% DTT), se centrifugó a 4° C por 15 min a 4.000 x g y el SN se conservó para el posterior análisis proteico, constituyendo la fracción proteica 3 (FP 3; Fig. 4), en tanto el precipitado final se descartó.

En la Fig. 4 se resume el protocolo 2.



**Figura 4.** Representación esquemática del protocolo 2 para la extracción secuencial de proteínas de pared celular a partir de la zona de elongación de ejes embrionales de soja (*G. max*), incubados durante nueve horas a  $27 \pm 1$  °C y oscuridad y las correspondientes fracciones proteínas (FP) obtenidas. \*Las etapas que comprenden la obtención de la FP 1 coinciden con las utilizadas para la fracción proteica de 12 horas (protocolo 1). Adaptado de Feiz *et al.* (2006).

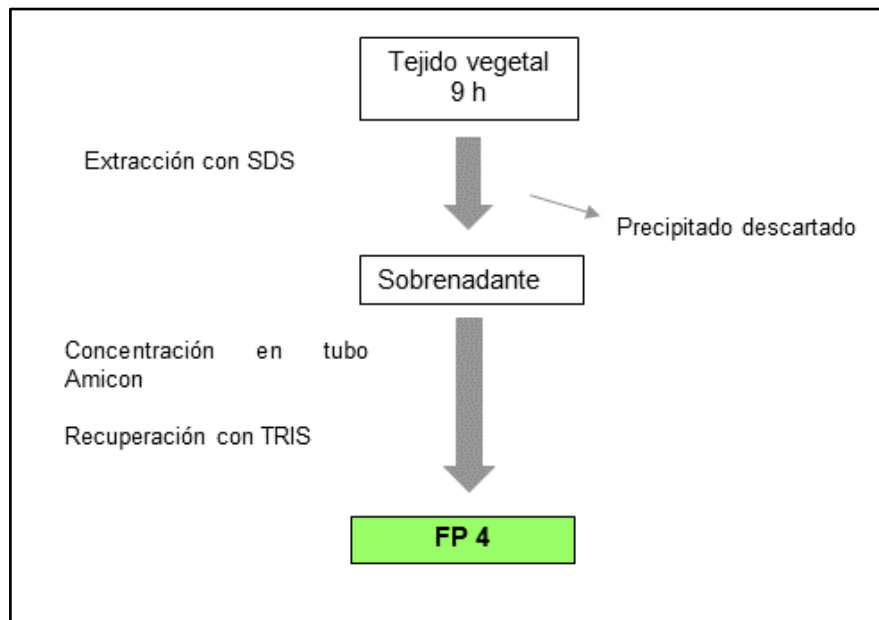
### **Protocolo 3) extracción de proteínas expansinas**

Se utilizó el protocolo propuesto por McQueen-Mason y Cosgrove (1995) para la extracción de expansinas de la pared de hipocótilos de pepino (*Cucumis sativus* L.), partiendo de 0,2 gramos de tejido de ZE.

Se pulverizó la muestra sobre el mortero en nitrógeno líquido y se extrajeron las proteínas con dos mL de solución de extracción (50 mM acetato de sodio pH 4,5 conteniendo 0,2 % SDS), manteniendo en agitación constante en hielo durante una hora. Se centrifugó a 4 °C por cinco min a 10.000 rpm y se descartó el precipitado. El SN se transfirió a un tubo Amicon (Millipore)

para concentrar las proteínas y luego se lavó con dos mL de agua deionizada en el mismo tubo para remover sales y detergente. Finalmente, se recuperaron las proteínas del filtro añadiendo 0,5 mL de solución de recuperación (20 mM TRIS pH 7), constituyendo la fracción proteica 4 (FP 4).

En la Fig. 5 se resume el protocolo 3.



**Figura 5.** Representación esquemática del protocolo 3 para la extracción de proteínas de pared celular a partir de la zona de elongación de ejes embrionales de soja (*G. max*), incubados durante nueve horas a  $27 \pm 1$  °C y oscuridad y la correspondiente fracción proteica (FP) obtenida. Adaptado de McQueen-Mason y Cosgrove (1995).

#### **Protocolo 4) extracción de proteínas de extensión de pared celular**

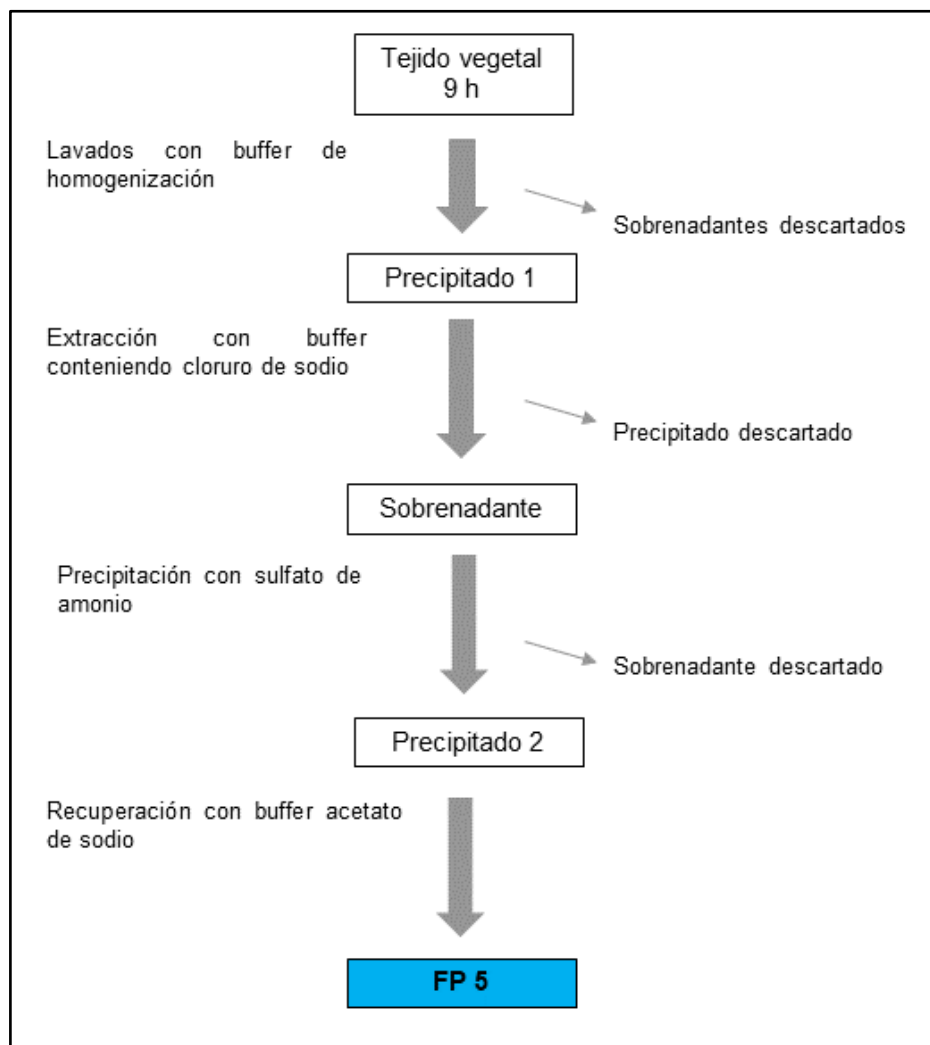
Se empleó, con leves modificaciones, el protocolo propuesto por McQueen-Mason *et al.* (1992) utilizado en hipocótilos de pepino (*Cucumis sativus* L.) para la obtención enriquecida de proteínas específicas vinculadas a los procesos de expansión de pared celular, partiendo de un gramo de tejido de ZE.

Se añadió un mL de buffer de homogenización (50mM acetato de sodio; 2 mM de EDTA; pH 4,5) al tejido y se pulverizó en nitrógeno líquido. Se centrifugó a 4 °C por cinco min a 10.000 rpm y se descartó el SN. Se repitió el mismo paso tres veces.

Se añadieron dos mL de buffer de extracción (20 mM HEPES; pH 6,8; 1 M cloruro de sodio; 2 mM EDTA; 3 mM metabisulfito de sodio) al precipitado enriquecido en los fragmentos de pared y se incubó en hielo, en agitación constante por cuatro horas. Se centrifugó a 4 °C por cinco min a 10.000 rpm y se descartó el precipitado. Se añadió de a poco 0,78 g de sulfato de amonio (0,390 g/mL) al SN y se incubó en hielo durante una hora en agitación

constante. Se centrifugó a 4 °C por cinco min a 10.000 rpm y se descartó el SN. Finalmente, se resuspendió el extracto proteico en 0,5 mL de 50 mM acetato de sodio y se conservó para el posterior análisis proteico, constituyendo la fracción proteica 5.

En la Fig. 6 se resume el protocolo 4.



**Figura 6.** Representación esquemática del protocolo 4 para la extracción de proteínas de extensión de pared celular a partir de la zona de elongación de ejes embrionales de soja (*G. max*), incubados durante nueve horas a  $27 \pm 1$  °C y oscuridad, y la correspondiente fracción proteica (FP) obtenida. Adaptado de McQueen-Mason *et al.* (1992).

### **Protocolo 5) extracción de proteínas totales**

El protocolo propuesto por Leonardi *et al.* (2015), para la extracción de proteínas totales de tallos de *Eucalyptus urograndis*, fue realizado con leves modificaciones, partiendo de 0,1 gramos de tejido de ZE.

Se añadió al tejido un mL de buffer de extracción (500 mM Tris; 50 mM EDTA; 700 mM sacarosa; 100 mM cloruro de potasio; pH 8), 2 % v/v de 2-mercaptoetanol, 1 mM PMSF y 6,25 mg/mL de

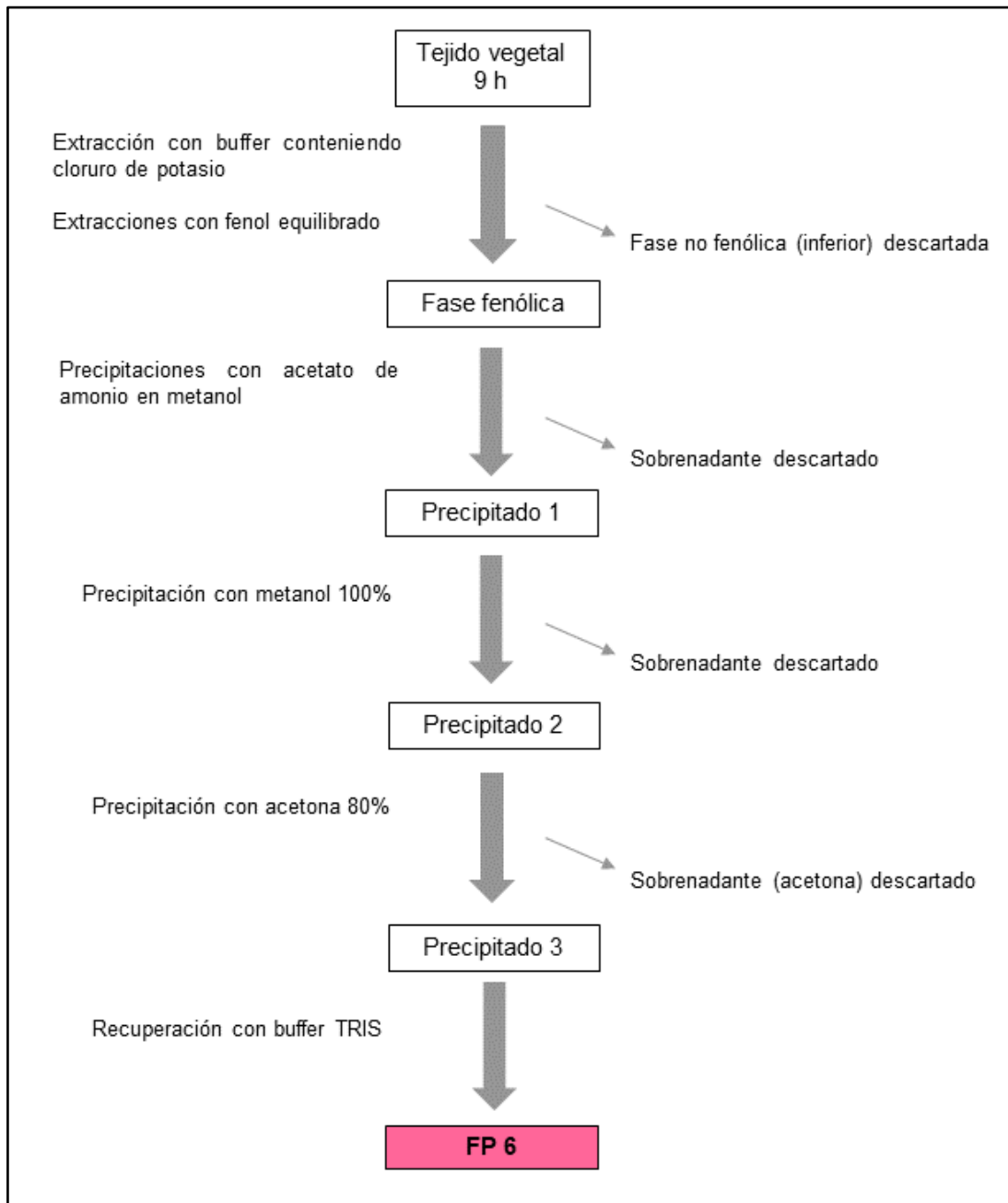
PVP en mortero. Se maceró hasta obtener una pasta homogénea y se añadió un mL de fenol equilibrado pH 8. Se trasvasó a un tubo Eppendorf y se incubó durante 15 min en hielo en agitación constante.

Se centrifugó a 4 °C por diez min a 10.000 x g, se descartó la fase no fenólica (inferior) y se repitió el paso de extracción con fenol. Se tomó la fase fenólica y se le añadió cinco volúmenes de solución de precipitación (100 mM acetato de amonio en metanol) y se dejó incubando toda la noche a -20 °C.

Se centrifugó a 4 °C por 20 min a 10.000 x g y se descartó el SN, se lavó el precipitado con 0,5 mL de solución de precipitación, rompiendo el pellet con el tip para favorecer el lavado. Se centrifugó a 4 °C por diez min a 10.000 x g, se descartó el SN y se repitió el paso de lavado y centrifugado.

Se lavó el precipitado con 0,5 mL de metanol 100% frío, se centrifugó a 4 °C por diez min a 10.000 x g y se descartó el SN. Se lavó el precipitado con 0,5 mL de acetona 80% fría, se centrifugó a 4 °C por diez min a 10.000 x g, se descartó la acetona y se dejó secando el pellet en campana de extracción de gases para favorecer la evaporación de la acetona residual. Finalmente, se resuspendió el pellet en 0,05 mL de solución de recuperación (20 mM TRIS pH 7) y se conservó para el posterior análisis proteico, constituyendo la fracción proteica 6.

En la Fig. 7 se resume el protocolo 5.



**Figura 7.** Representación esquemática del protocolo 5 para la extracción de proteínas totales a partir de la zona de elongación de ejes embrionales de soja (*G. max*), incubados durante nueve horas a  $27 \pm 1$  °C y oscuridad, y la correspondiente fracción proteica (FP) obtenida. Adaptado de Leonardí *et al.* (2015).

### ***Determinación de concentración de proteínas totales***

A partir de una alícuota de 15 µL de cada fracción proteica se cuantificó por espectrofotometría la correspondiente concentración de proteínas totales, de acuerdo al método de Bradford (1976). Para ello, se construyó una curva de calibración a partir de albúmina de suero vacuno como estándar (BSA). Se realizaron diluciones seriadas de 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 y 1 mg/mL. Se determinó la concentración utilizando 195 µL de una dilución 1:5 del Reactivo de Bradford, completando con cinco µL ( $V_f = 200$  µL) de las

diluciones seriadas de BSA o las respectivas fracciones proteicas. Se utilizaron los correspondientes buffers en los que se encontraban las diferentes fracciones proteicas como blanco. Las determinaciones se hicieron por duplicado. Las determinaciones de absorbancia se realizaron en lector de microplacas BioTek (ELX 800), a una  $\lambda = 595$  nm. La concentración proteica de las diferentes fracciones se determinó por interpolación en la curva de calibración.

### ***Análisis de las fracciones proteicas mediante SDS-PAGE***

Se realizó una electroforesis en gel monodimensional de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando la celda Mini-PROTEAN IV (Bio-Rad) de acuerdo al sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). La concentración final de acrilamida fue de 8% para el gel de separación y 4% para el gel de concentración. Se sembraron 40  $\mu$ L de cada una de las fracciones proteicas diluidas al quinto en buffer de siembra 5X (60 mM Tris-ácido clorhídrico pH 6,8; 25% (v/v) glicerol; 2% (P/V) SDS; 5% (v/v) 2-mercaptoetanol; 0,1% (P/V) azul de bromofenol). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y posteriormente desteñidos y analizados. Siguiendo las instrucciones del servicio de la Unidad de Espectrometría de Masas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (UEM-IBR), la corrida electroforética se realizó a 20 mA hasta que el frente de las muestras migró un cm en el gel de separación. Este procedimiento permitió concentrar las proteínas de cada fracción en una única banda en el gel.

Luego se procedió a la escisión de las bandas de interés del gel con un bisturí. Para cada fracción se cortó aproximadamente un  $\text{cm}^2$  que incluyó el patrón de bandas, y éste a su vez en porciones más pequeñas que fueron depositadas en un tubo Eppendorf rotulado de acuerdo a la fracción proteica contenida y enviados a la UEM-IBR para el posterior análisis.

### **Identificación del perfil proteómico contenido en las fracciones proteicas**

Los materiales y métodos a continuación fueron realizados y descritos por el servicio provisto por la UEM-IBR.

### ***Análisis de las fracciones proteicas por Cromatografía Líquida seguida de Espectrometría de Masas (LC-MS)***

Las fracciones proteicas fueron inicialmente procesadas de acuerdo al protocolo de Link y LaBaer (2009). Las muestras fueron hidrolizadas con tripsina (corte específico en aminoácidos Lisina y Arginina) para obtener los correspondientes péptidos trípticos. Se sembraron dos  $\mu$ L de péptidos trípticos de cada muestra en un espectrómetro de masa

Q-Exactive HF en modo positivo. La separación de péptidos se realizó en un nanoHPLC Ultimate3.000 equipado con una nanocolumna C18 de 50 cm (ES903, Thermo). El gradiente de elución consistió en una mezcla de solventes (agua, “solvente A” y acetonitrilo, “solvente B”, ambos conteniendo 0,1% ácido fórmico). La tasa de elución fue de 300 nL/min. El perfil cromatográfico fue el siguiente: 5–35% solvente B durante 90 min, 35%-90% solvente B durante 20 min y 90% solvente B durante cinco min.

Los datos obtenidos se analizaron en ProteomeDiscoverer 2.4, utilizando como base de datos la correspondiente a *G. max*. La base de datos se descargó de Uniprot y se utilizaron parámetros de búsqueda estándares para instrumental Orbitrap. Se toleraron hasta dos digestiones fallidas de tripsina. En todos los casos, se incorporaron las siguientes modificaciones: carbamidometilación de cisteínas (modificación fija), acetilación N-terminal y oxidación de metioninas (modificaciones variables).

Los análisis de Espectrometría de Masas fueron hechos usando un espectrómetro de masas (MS) Q-Exactive HF (Thermo Scientific). Para la ionización, se usó un líquido de salida a 1,9 kV y una temperatura de capilar de 250 °C. El método de escaneo completo empleó una selección de masa  $m/z$  375–1600, una resolución Orbitrap de 120000 (a  $m/z$  200), un valor de control automático de ganancia (AGC) objetivo de  $3e^6$  y tiempos máximos de inyección (TI) de 100 ms. Después del examen exploratorio, se seleccionaron los 20 iones precursores más intensos para la fragmentación MS/MS. La fragmentación se realizó con una energía de colisión normalizada de 27 eV y los escaneos MS/MS se adquirieron con una primera masa dinámica, el objetivo de AGC fue  $5e^5$ , resolución de 30.000 (a  $m/z$  200), umbral de intensidad de  $4,0 e^4$ , ventana de aislamiento de 1,4 unidades  $m/z$  y el TI máximo fue de 200 ms. La detección del estado de carga se habilitó para rechazar iones no asignados, cargados individualmente e iguales o más de siete iones protonados. Se utilizó un tiempo de exclusión dinámico de 15 s para discriminar los iones previamente seleccionados.

### ***Análisis de datos de Espectrometría de Masa (MS)***

Los datos de MS se analizaron con Proteome Discoverer (versión 2.4; Thermo) utilizando flujos de trabajo estandarizados. Los archivos de espectros de masas (.raw) se buscaron en una base de datos interna específica Uniprot *Mus musculus* modificada mediante la adición de secuencia de la proteína fluorescente verde y de la proteína B1 miembro de la familia uno de aldo-ceto reductasa (17.023 secuencias; 9.624.594 residuos) utilizando el motor de búsqueda Mascot (versión 2.6, Ciencia matricial). La tolerancia de precursor y fragmento de masa se estableció en diez ppm y 0,02 Da, respectivamente, lo que permitió

dos escisiones fallidas, carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, oxidación de metionina y acetilación N-terminal como modificación variable. Los péptidos identificados se filtraron utilizando el algoritmo Percolator (1) con un valor umbral q de 0,01.

### ***Identificación de proteínas y análisis bioinformático***

Se analizaron los perfiles proteómicos presentes en las fracciones proteicas correspondientes a las ZE de E de soja incubados por 12 y nueve horas (FP 1 a 6) en condiciones adecuadas de germinación. Se clasificaron las proteínas según su rol funcional y metabólico con el objetivo de caracterizar los procesos fisiológicos y/o moleculares involucrados a cada tiempo de incubación e identificar el tiempo de incubación que describe más cabalmente los eventos tempranos que completan la germinación. Adicionalmente, se analizaron los perfiles proteómicos correspondientes a las ZE de E de soja incubados por nueve horas en condiciones adecuadas de germinación (FP 1 a 6), con el objetivo de identificar el protocolo de extracción proteica mayormente enriquecido en proteínas de remodelamiento de paredes celulares responsables del proceso expansivo que define la germinación.

En ambas instancias se consultaron y utilizaron bases de datos en línea y softwares bioinformáticos de acceso libre, los cuales se describen a continuación.

### ***Asignación de proteínas de soja no caracterizadas***

Las secuencias proteicas que fueran informadas como no caracterizadas por la UEM-IBR en las respectivas fracciones proteicas fueron asignadas a partir de las correspondientes secuencias ortólogas de *Arabidopsis thaliana* identificadas por homología BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se consultaron los bancos de genes públicos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) y Phytozome (<http://www.phytozome.net>).

### ***Caracterización de perfiles proteómicos***

Para cada una de las fracciones proteicas, se realizaron estudios complementarios sobre el perfil de proteínas presentes, con el objetivo de lograr una mejor descripción de los procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares implicados en cada caso. Los análisis involucraron el uso de bases de datos, bancos de genes y softwares informáticos de acceso libre y ejecución en línea: Phytozome (<http://www.phytozome.net>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>), BUSCA (<http://busca.biocomp.unibo.it/>), TargetP 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>), AgriGO

(<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>)

y

ShinyGO

(<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>).

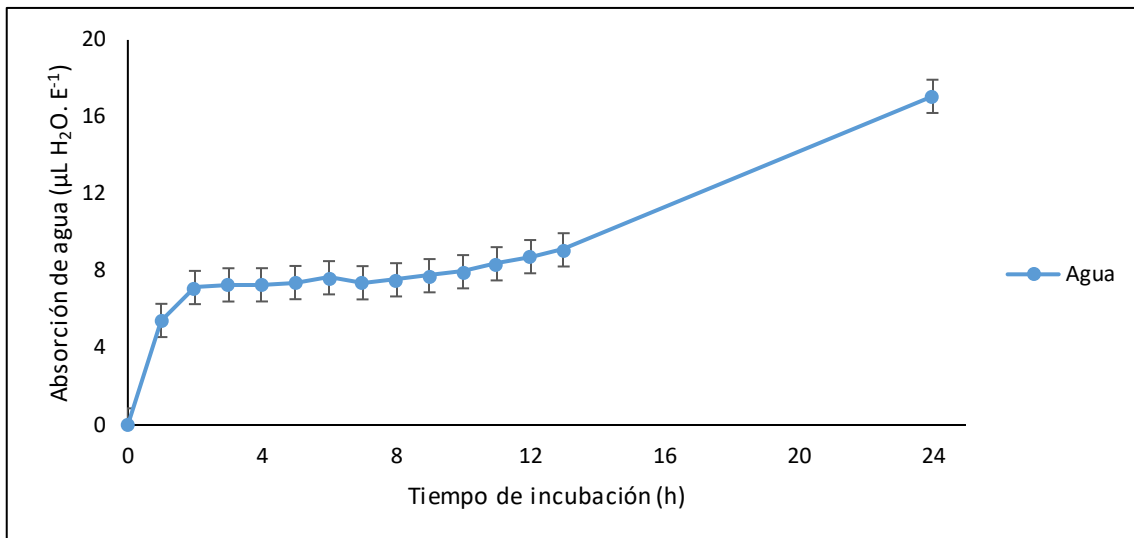
## RESULTADOS

### Ensayos de germinación

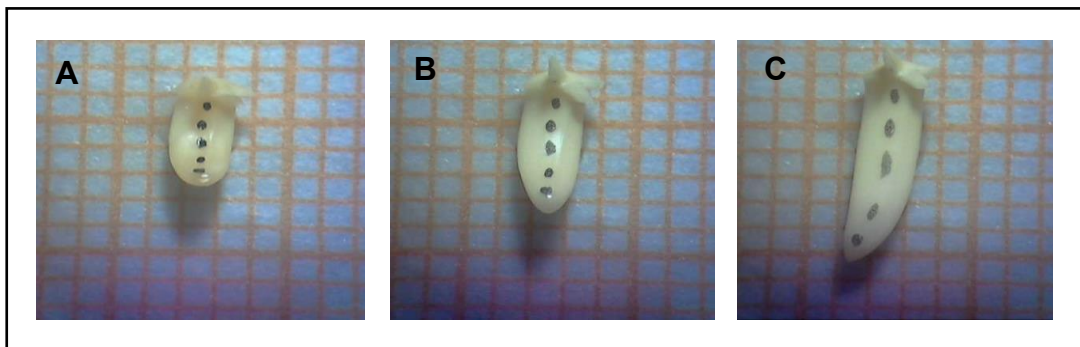
Se llevaron a cabo incubaciones de ejes embrionales (E) de soja con dos propósitos generales. Por un lado, se incubaron E en un único medio con el objetivo de evaluar condiciones adecuadas o inhibitorias de germinación. Por otro lado, se realizaron incubaciones de E en un medio inicial inhibitorio de la germinación, seguido de la transferencia y posterior incubación en condiciones de germinación en agua destilada. Los objetivos específicos se describen a continuación para cada ensayo.

#### ***Ensayo I: incubación de ejes embrionales en agua, PEG, ácido abscísico y cicloheximida***

Dada la naturaleza expansiva que define la germinación, conducida por la absorción de agua que experimentan los E de las semillas durante la incubación, se estudió la dinámica de absorción de agua de E de soja en condiciones adecuadas de germinación en agua destilada. De manera comparativa, se estudió la dinámica en tres medios inhibitorios del proceso operando bajo mecanismos de acción diferentes. Por un lado, se estudió la condición inhibitoria de la germinación como consecuencia de una baja disponibilidad de agua libre para la absorción por parte de los E durante la incubación en solución -1 MPa de PEG. En segundo lugar, se evaluó el efecto represor del ácido abscísico (ABA) sobre el remodelamiento de pared celular evitando la expansión celular durante la imbibición. Por último, se estudió la incubación en cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica en eucariotas y, en consecuencia, de las proteínas necesarias para que la germinación ocurra. En la Fig. 8 se muestra la curva trifásica de absorción característica de los E durante la incubación en agua destilada, correspondiente a la condición control de germinación. Los E absorbieron agua rápidamente alcanzando la fase II con un volumen promedio de 7,14  $\mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$  alrededor de las dos horas del inicio de la incubación y permaneciendo en dicha fase hasta aproximadamente las ocho horas. A partir de este momento la absorción de agua se reinició, presentándose la totalidad de los E visiblemente alargados a las 12 h (Fig. 9) y absorbiendo 17,07  $\mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$  a las 24 h de incubación.

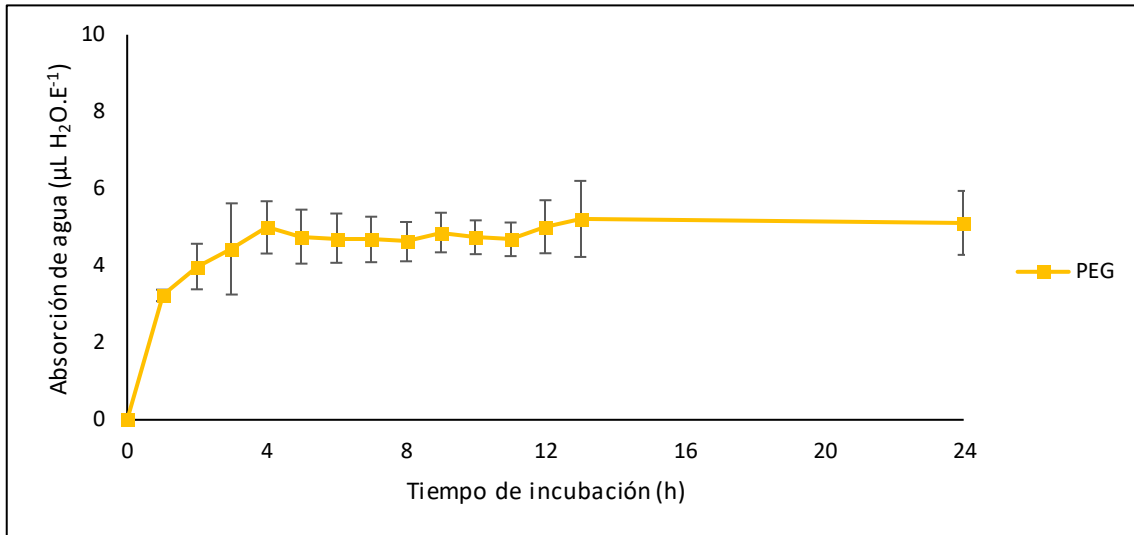


**Figura 8.** Absorción de agua ( $\mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$ ) de ejes embrionales de soja (*G. max*) incubados en agua destilada durante 24 h a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  y oscuridad. Los puntos representan el promedio  $\pm$  DE para tres réplicas de diez ejes cada una.



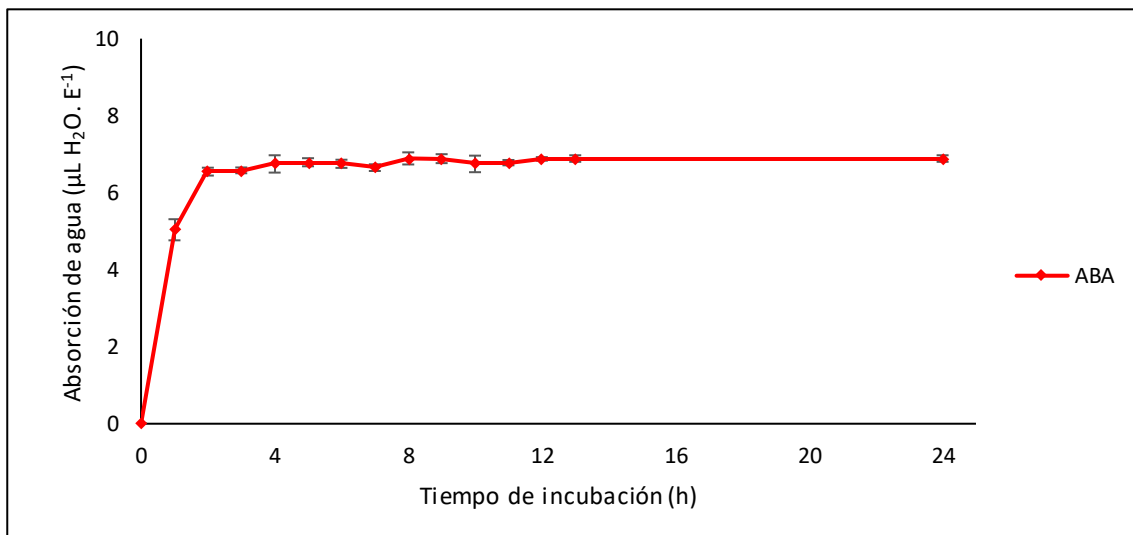
**Figura 9.** Ejcs embrionales de soja (*G. max*) incubados en agua destilada durante: **A)** 0 h; **B)** 9 h y **C)** 12 h a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  y oscuridad.

La Fig. 10 corresponde a la dinámica de imbibición de E de soja incubados en solución -1 MPa de PEG. Se evidencia que la germinación resultó totalmente inhibida. Adicionalmente, se registró un retraso en el inicio de la fase II (entre las tres y cuatro horas) y un contenido de agua absorbido menor ( $5,11 \mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$ ) al final del experimento respecto al control en agua, como resultado de la baja disponibilidad hídrica para la imbibición.



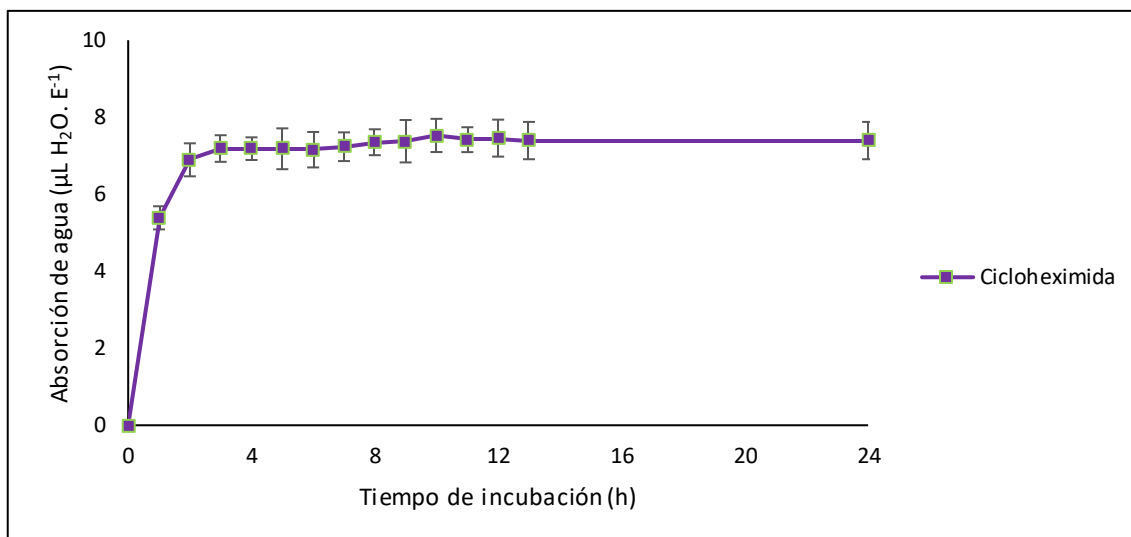
**Figura 10.** Absorción de agua ( $\mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$ ) de ejes embrionales de soja (*G. max*) incubados en solución  $-1 \text{ MPa}$  de PEG durante 24 h a  $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y oscuridad. Los puntos representan el promedio  $\pm \text{DE}$  para tres réplicas de diez estructuras cada una.

La germinación también se vio inhibida frente a la incubación de E en solución  $100 \mu\text{M}$  de ABA (Fig. 11). Al igual que para la condición control (Fig. 8), los E no presentaron dificultades para absorber agua en el inicio de la incubación, alcanzando la fase II aproximadamente a las dos horas, con un volumen de agua promedio absorbido similar ( $6,54 \mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$ ). A partir de este momento los E se mantuvieron en fase II, sin iniciar la fase III (germinación *sensu stricto*) hasta el final del experimento (Fig. 11).



**Figura 11.** Absorción de agua ( $\mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$ ) de ejes embrionales de soja (*G. max*) incubados en solución  $100 \mu\text{M}$  de ABA durante 24 h a  $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y oscuridad. Los puntos representan el promedio  $\pm \text{DE}$  para tres réplicas de diez estructuras cada una.

Análogamente a las incubaciones en PEG (Fig. 10) y ABA (Fig. 11), la germinación de los E resultó también inhibida durante la incubación en solución 100  $\mu\text{M}$  de cicloheximida (Fig. 12). Nuevamente, los E absorbieron agua rápidamente, alcanzando la fase II a las dos horas con un contenido promedio de 6,89  $\mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$  y permaneciendo en dicha fase hasta el final del experimento.



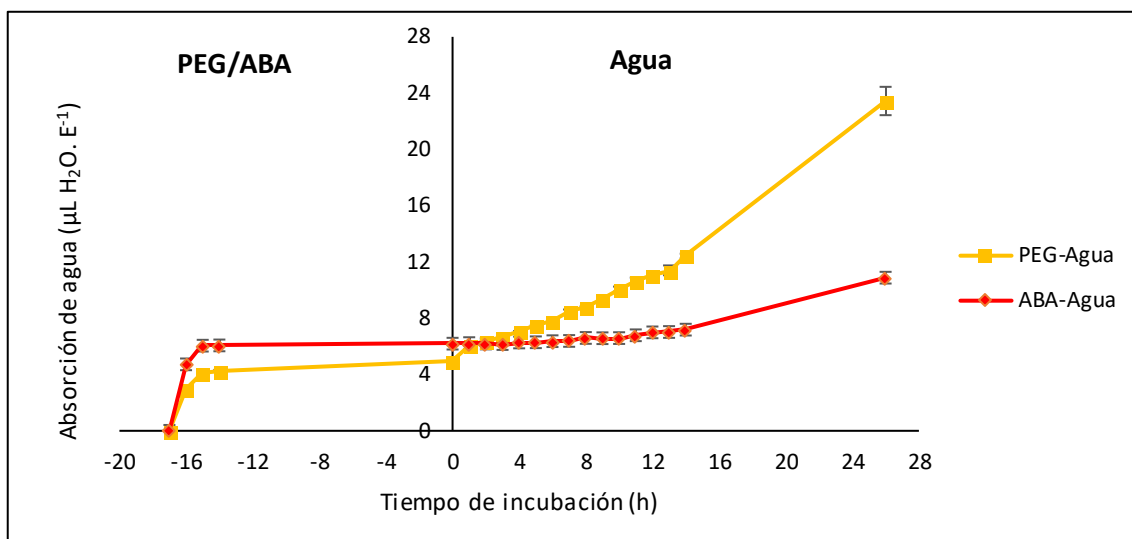
**Figura 12.** Absorción de agua ( $\mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$ ) de ejes embrionales de soja (*G. max*) incubados en 100  $\mu\text{M}$  de cicloheximida durante 24 h a  $27 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$  y oscuridad. Los puntos representan el promedio  $\pm$  DE para tres réplicas de diez estructuras cada una.

### ***Ensayo II: incubación de ejes embrionales en ácido abscísico y PEG seguida de transferencia a agua***

Con el objetivo de profundizar el estudio del efecto inhibitorio por ABA y PEG sobre la germinación de E de soja, se realizaron ensayos de transferencias desde el correspondiente medio inhibitorio inicial a una condición de incubación final promotora del proceso en agua destilada.

Los E incubados en solución -1 MPa de PEG o 100  $\mu\text{M}$  de ABA rápidamente absorbieron agua (de manera más paulatina en el primer caso), finalizando la fase I entre las dos y tres horas de imbibición, permaneciendo en fase II hasta las 17 h de incubación, con un volumen de agua absorbido de 5,01 y 6,19  $\mu\text{L H}_2\text{O. E}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 13). A las 17 horas los E de ambos tratamientos fueron transferidos a agua destilada durante las siguientes 26 horas para inducir la germinación. Inmediatamente luego de la transferencia, los E previamente incubados en PEG reiniciaron la absorción de agua en cantidades importantes, mientras que los E preincubados en ABA continuaron en fase II sin absorción de agua durante las siguientes diez horas aproximadamente, aumentando a continuación a un ritmo

más bien lento. Hacia el final del experimento los E preincubados en PEG alcanzaron los 23,44  $\mu\text{L H}_2\text{O} \cdot \text{E}^{-1}$  mientras que los preincubados en ABA absorbieron menos de la mitad (10,88  $\mu\text{L H}_2\text{O} \cdot \text{E}^{-1}$ ; Fig.13).



**Figura 13.** Absorción de agua ( $\mu\text{L H}_2\text{O} \cdot \text{E}^{-1}$ ) de ejes embrionales de soja (*G. max*) incubados en solución de Polietilenglicol 8000 (PEG) de  $\Psi_a = -1$  MPa o 100  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico (ABA) durante 17 h (valores negativos en el eje de abscisas) y luego transferidos e incubados en agua destilada durante 26 h más (valores positivos en el eje de abscisas). Las incubaciones se realizaron a  $27 \pm 1$  °C y oscuridad. Los puntos representan el promedio  $\pm$  DE para tres réplicas de diez ejes embrionales cada una.

Adicionalmente, la tasa de absorción de agua, calculada como la pendiente en fase III luego de la transferencia a agua destilada resultó mayor, aunque no significativamente ( $p=0,4386$ ), para los E preincubados en PEG ( $0,5357 \mu\text{LH}_2\text{O} \cdot \text{E}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) que para aquellos preincubados en ABA ( $0,4558 \mu\text{LH}_2\text{O} \cdot \text{E}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

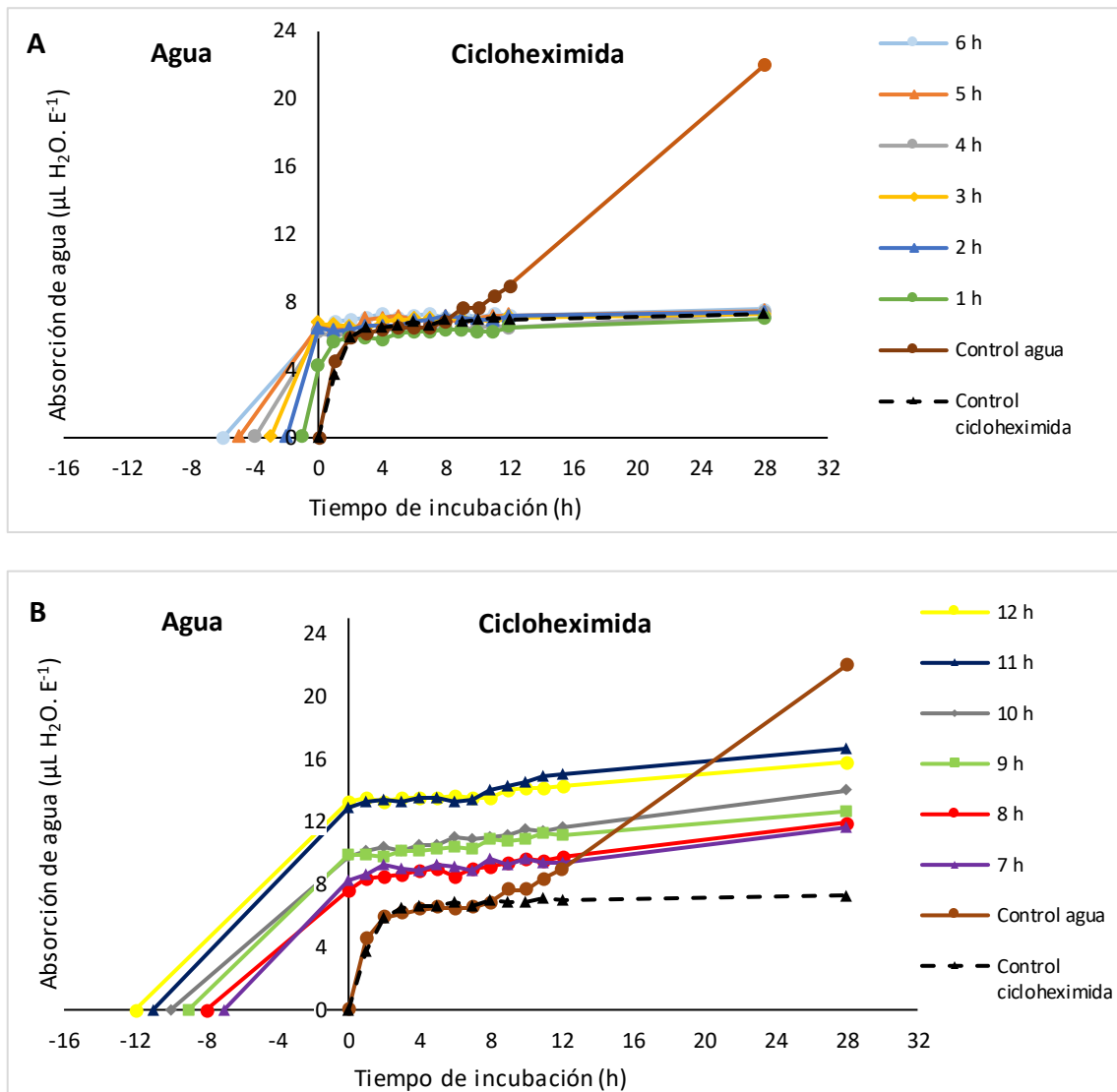
### **Ensayo III: ventana de tiempo de proteínas de la germinación**

Los antecedentes indican que, si bien la germinación es posible a partir de los *ARNm* sintetizados en las semillas a través del desarrollo y almacenados en las mismas a la madurez, es condición necesaria la síntesis *de novo* de las correspondientes proteínas para que el proceso ocurra. En este sentido, se estudió la incubación de E de soja en condiciones propicias de germinación en agua destilada seguido de su transferencia, a intervalos de tiempo progresivos, a un medio conteniendo el inhibidor de traducción cicloheximida, con el objetivo de identificar la ventana de tiempo de respuesta al inhibidor; entendida como el tiempo de síntesis de proteínas mínimo requerido para definir la germinación.

Los tiempos de incubación negativos en el eje de abscisas (Fig. 14) identifican las horas de incubación previas en agua, en tanto los valores positivos corresponden al tiempo de

incubación de los E una vez transferidos a cicloheximida. La ganancia de agua inicial (tiempo de incubación = 0 h) correspondió a la registrada al momento de la transferencia a cicloheximida. La curva correspondiente al control de incubación en cicloheximida (Fig. 14 A) experimentó un aumento importante en la absorción de agua durante las dos primeras horas que duró la fase I ( $5,88 \mu\text{L H}_2\text{O} \cdot \text{E}^{-1}$ ), permaneciendo luego en fase II hasta finalizar el experimento. Resultados similares se obtuvieron para los E incubados en agua hasta seis horas inclusive, los cuales absorbieron agua hasta alcanzar la fase II al momento o luego de la transferencia, pero luego la absorción se detuvo manteniendo estable el volumen de agua absorbida (alrededor de  $7,30 \mu\text{L H}_2\text{O} \cdot \text{E}^{-1}$ ) durante toda la incubación en cicloheximida y no lograron entrar en fase III (Fig. 14 A).

Por el contrario, los ejes incubados en agua por siete y hasta 12 h (Fig. 14 B) presentaron un aumento de absorción de agua sostenido, aún luego de la transferencia a cicloheximida, en términos generales con absorción de agua inicial (Fig. 14 B,  $t = 0$ ) y final mayor cuanto mayor fue el tiempo de permanencia en el medio inicial (agua).



**Figura 14.** Absorción de agua ( $\mu\text{L H}_2\text{O} \cdot \text{E}^{-1}$ ) de ejes embrionales de soja (*G. max*) en solución  $100 \mu\text{M}$  de cicloheximida durante 28 h (medio de incubación final) que fueron preincubados por **A)** 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h y **B)** 7, 8, 9, 10, 11 y 12 h 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 (cicloheximida). Las incubaciones se realizaron a  $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y oscuridad. Los puntos representan el promedio de diez ejes embrionales para cada condición.

Estos resultados mostraron que la incubación previa por siete o más horas en agua destilada fueron suficientes para permitir iniciar y completar la germinación de los E aún luego de la transferencia e incubación en cicloheximida (Fig. 14).

## **Identificación y caracterización del perfil proteómico de germinación de ejes embrionales de soja**

### ***Proteínas en zona de elongación de ejes embrionales incubados 12 horas***

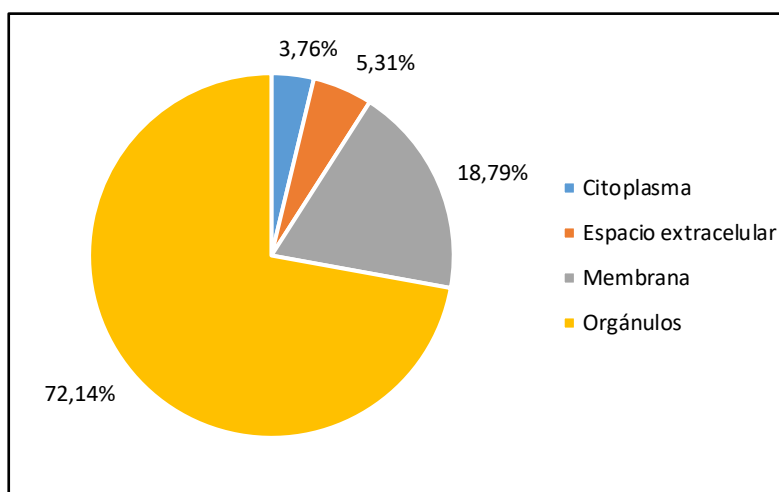
La extracción proteica de E incubados 12 h en agua destilada estéril (obtenida según protocolo 1) y su posterior análisis mediante LC-MS permitió identificar un total de 2.673 proteínas con al menos dos péptidos de alta confianza. Se consultó la base de datos disponible en UniProt para asignar los péptidos obtenidos bajo esta fracción. Las proteínas informadas como no caracterizadas se ingresaron en la base de datos de Phytozome para buscar las correspondientes proteínas ortólogas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Arabidopsis) por medio de análisis BLAST. Esta herramienta permitió asignar una función a proteínas desconocidas a partir de la función de su proteína ortóloga.

Se realizó un análisis de enriquecimiento por ontología génica (GO) utilizando la plataforma web AgriGO, recurriendo a la metodología SEA (Singular Enrichment Analysis), para establecer las categorías enriquecidas bajo este tiempo de incubación estudiado. De acuerdo con la base de datos GO, las proteínas se clasificaron según tres categorías principales: procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares.

De las 2.673 proteínas encontradas a las 12 h de incubación, algunas de las categorías que se enriquecieron dentro de los procesos biológicos fueron: respuesta a estímulos (715), desarrollo de estructuras anatómicas (453), desarrollo post-embrionario (336), señalización (280), transducción de señales (190), diferenciación celular (157), desarrollo del meristema (94), desarrollo del sistema radicular (94), comunicación celular (85), división celular (81) y replicación de ADN (48). Dentro de funciones moleculares se encontraron enriquecidas: actividad catalítica (954), actividad de transporte (198) y actividad de transducción de señales (44). En cuanto a componentes celulares, se asignaron de la siguiente manera: orgánulos (1.456), citoplasma (1.145), membrana (755) y pared celular (102).

Adicionalmente, se identificó la localización subcelular de las proteínas halladas utilizando el programa BUSCA, basado en la identificación de péptidos señal, péptidos dirigidos a orgánulos (mitocondrias y cloroplastos), anclajes glicofosfatidilinositol y dominios transmembrana alfa y beta. Las proteínas resultaron agrupadas en cuatro categorías generales: orgánulos (incluye las categorías mitocondria, núcleo, cloroplasto, lumen de los tilacoides, estroma, plastoglobulos, membrana de organelas, membrana mitocondrial, membrana cloroplástica externa, membrana cloroplástica interna, membrana de los tilacoides y sistema de endomembranas); membrana (incluye las categorías anclado a membrana y membrana plasmática); espacio extracelular y citoplasma. Los resultados

mostraron (Fig. 15) que las proteínas de 12 h correspondieron en su mayoría a orgánulos (72,14%), seguidas por proteínas pertenecientes a membrana (18,79%), al espacio extracelular (5,31%) y citoplasma (3,76%).



**Figura 15.** Localización subcelular de proteínas obtenidas bajo el protocolo de extracción propuesto por Feiz *et al.* (2006) a partir de la zona de elongación de ejes embrionales de soja (*G. max*) incubados 12 horas.

Estos resultados dieron cuenta eventos de naturaleza preferentemente post germinativa, tales como el establecimiento de la división celular y una extensiva activación de mecanismos de señalización, comunicación y transducción de señales que estarían afectando la expresión génica y gatillando el desarrollo y establecimiento de estructuras anatómicas. Adicionalmente, no fueron halladas proteínas de remodelamiento de pared celular implicadas en los procesos de expansión vegetal.

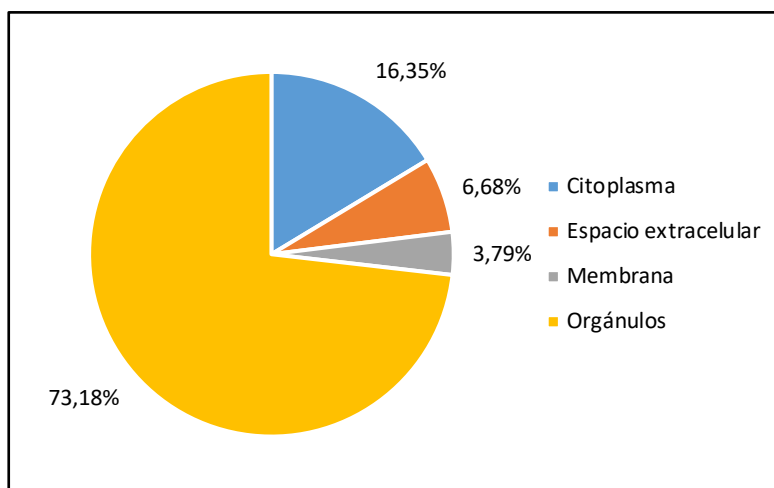
### ***Proteínas en zona de elongación de ejes embrionales incubados nueve horas***

La extracción proteica secuencial de E incubados nueve horas en agua destilada (obtenida según protocolo 2), permitió identificar un total de 1.094 proteínas únicas con al menos dos péptidos de alta confianza, de las cuales 47, 119 y 1.033 correspondieron a las fracciones proteicas (FP) 1, 2 y 3 respectivamente, asignados a partir de la base de datos disponible de UniProt.

El análisis de enriquecimiento por GO de las 1.094 proteínas analizadas en conjunto mostró categorías enriquecidas dentro de procesos biológicos, como: expresión génica (149), traducción (112), desarrollo embrionario (42), finalización del desarrollo embrional en semillas con latencia (38), generación de metabolitos precursores y energía (25) y respiración (13); dentro de funciones moleculares se encontraron más representadas: actividad catalítica (320), constituyente estructural del ribosoma (78) y actividad de

transporte de proteínas (11). Finalmente, como componentes celulares: citoplasma (415), mitocondria (135), ribosoma (82), pared celular (40) y cadena respiratoria (20).

La localización subcelular (Fig. 16) del total de proteínas halladas en las tres fracciones determinó que el mayor porcentaje (73,18%) correspondió a orgánulos, seguido de proteínas de citoplasma (16,35%), espacio extracelular (6,68%) y membrana (3,79%).



**Figura 16.** Localización subcelular de proteínas obtenidas bajo el protocolo de extracción secuencial propuesto por Feiz *et al.* (2006) a partir de la zona de elongación de ejes embrionales de soja (*G. max*) incubados nueve horas.

La clasificación por GO de las proteínas totales mostró un enriquecimiento en proteínas asociadas a procesos de traducción y expresión génica, catabolismo y obtención de energía, finalización del desarrollo y dormición embrionaria, evidenciando una gran actividad celular vinculada a eventos tempranos que definen la germinación. No obstante, tampoco se encontraron proteínas de remodelamiento de pared celular en ninguna de las tres fracciones.

### ***Selección de un protocolo de extracción proteica representativo de la naturaleza expansiva de la germinación***

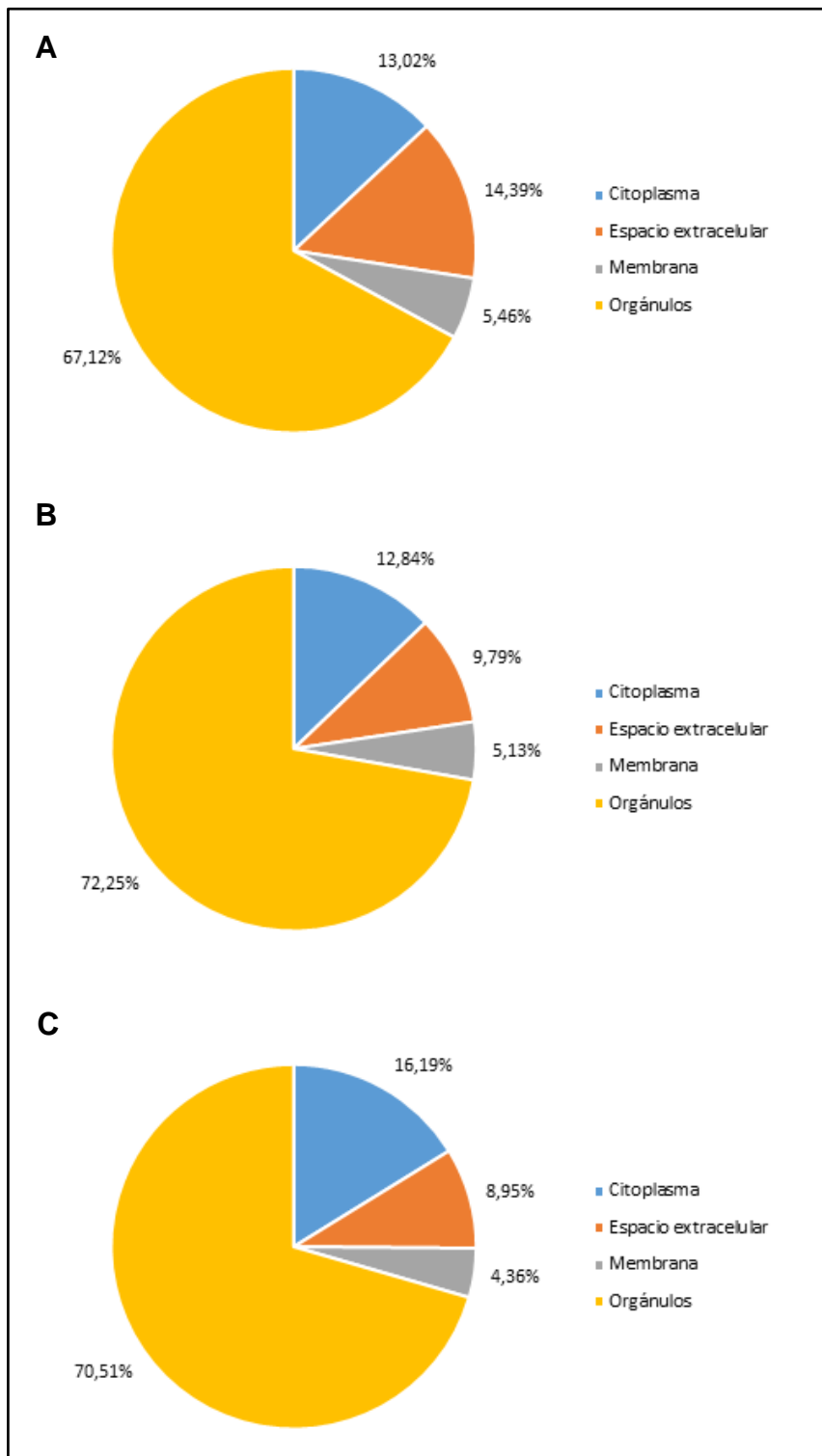
De acuerdo al rol primario asignado a las proteínas de pared celular en los procesos de expansión vegetal, se evaluaron dos protocolos de extracción de proteínas de pared (protocolos 3 y 4). Adicionalmente, se incluyó en el estudio un protocolo de extracción de proteínas totales (protocolo 5). Se consultó la base de datos disponible de UniProt para asignar los péptidos obtenidos en las respectivas fracciones obtenidas (FP 4, 5 y 6). El total de proteínas encontradas fue de 1.098, 2.984 y 1.699 para las FP 4, 5 y 6 respectivamente. El análisis de enriquecimiento por GO se realizó utilizando el programa ShinyGO 0.76, que permite el mismo tipo de análisis que AgriGO. En la Tabla 2 se muestran algunos de los

procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares que preferentemente describen de eventos tempranos de germinación hallados en las FP 4, 5 y 6.

**Tabla 2.** Categorías funcionales de las proteínas halladas en las fracciones proteicas (FP) 4, 5 y 6 más representativas de los eventos tempranos de la germinación. Los datos numéricos indican la cantidad de proteínas en cada categoría.

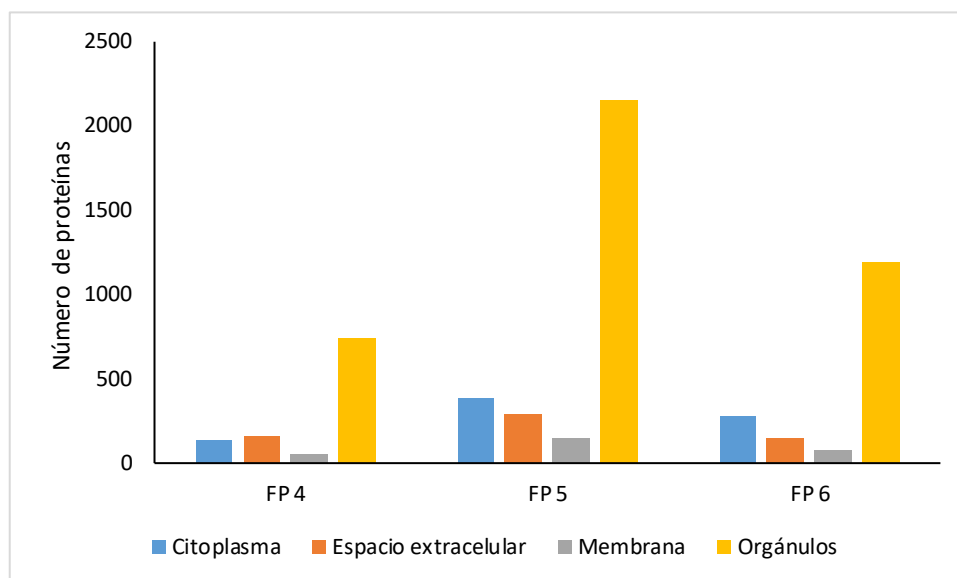
	FP 4	FP 5	FP 6
<b>Procesos biológicos</b>			
Traducción	116	332	217
Respiración	20	64	48
Dormición de semilla	4	6	-
Generación de metabolitos y energía	69	158	120
<b>Funciones moleculares</b>			
Constituyente estructural de ribosoma	131	193	134
<b>Componentes celulares</b>			
Ribosoma	137	211	141
Complejo catalítico	68	208	122
Espacio extracelular	-	22	-
Pared celular	23	-	-
Complejo de la cadena respiratoria	14	33	22

La localización subcelular de las proteínas informadas por BUSCA mostró un patrón similar en las tres fracciones (Fig. 17). Para todos los casos, más de la mitad de las proteínas pertenecieron a orgánulos, seguidas de proteínas citoplasmáticas o del espacio extracelular y en último lugar las de membrana.



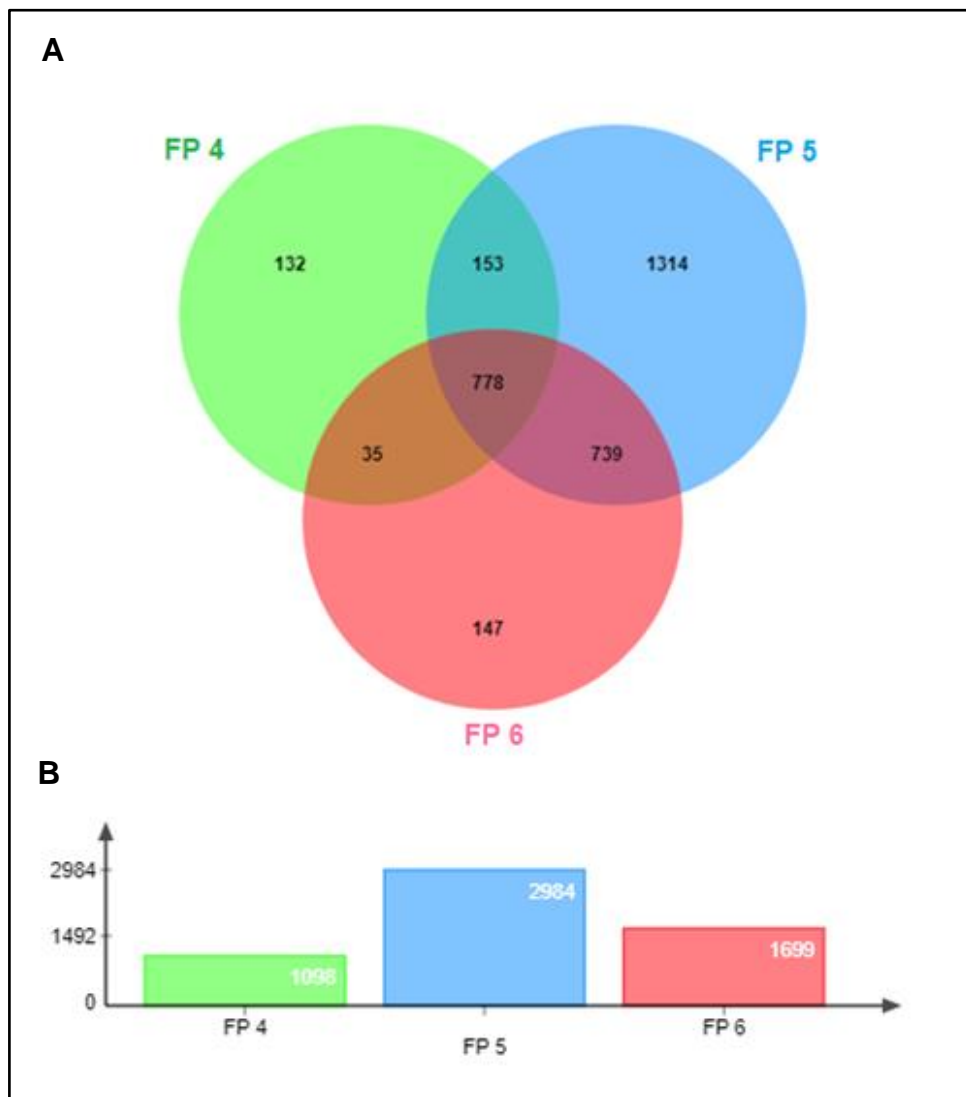
**Figura 17.** Localización subcelular de proteínas obtenidas en las distintas fracciones proteicas (FP). **A)** FP 4; **B)** FP 5; **C)** FP 6 a partir de la zona de elongación de ejes embrionales de soja (*G. max*) incubados nueve horas.

La FP 5 resultó en el mayor número de proteínas totales extraídas (2.984), las cuales resultaron, a su vez, en mayor cantidad para cada uno de los compartimentos subcelulares estudiados (Fig. 18).



**Figura 18.** Número de proteínas halladas por fracción proteica (FP) y por localización subcelular.

Para comparar y visualizar de manera esquemática las FP 4, 5 y 6 desde el punto de vista de las proteínas en común y exclusivas extraídas en cada caso, se utilizó la aplicación web jvenn (Fig. 19). Del total de proteínas (3.298) encontradas entre las FP 4 (1.098), 5 (2.984) y 6 (1.699), 778 resultaron compartidas entre las tres fracciones, 132 (4%) fueron exclusivas de la FP 4, 1.314 (40%) de la FP 5 y 147 (4,5%) de la FP 6.



**Figura 19. A)** Comparación de proteínas obtenidas en las fracciones proteicas (FP) 4, 5 y 6. El área superpuesta representa las proteínas compartidas entre las respectivas fracciones. **B)** Cantidad total de proteínas para las FP 4, 5 y 6. Análisis con jvenn.

Adicionalmente, la base de datos de UniProt permitió identificar 16 proteínas de remodelamiento de pared celular, todas ellas presentes en la FP 5, cuatro en la FP 4 y siete en la FP 6. En la Tabla 3 se muestran estos datos tal como fueron remitidos por el servicio de LC-MS del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (UEM-IBR), indicando su presencia o ausencia en las respectivas fracciones.

**Tabla 3.** Proteínas de remodelamiento de pared celular presentes en las fracciones proteicas (FP) 4, 5 y 6 remitidas por la UEM-IBR; **“X”**: presencia; **“-”**: ausencia. **Cobertura**: porcentaje de la secuencia proteica informada que ha sido identificada; **Péptidos**: cantidad de péptidos identificados para la secuencia proteica informada; **PSMs**: número total de espectros de péptidos identificados que coinciden con la secuencia de la proteína informada; **Péptidos únicos**: cantidad de péptidos identificados para la secuencia proteica informada que corresponden únicamente a dicha secuencia; **AAs**: cantidad de aminoácidos de la secuencia proteica informada; **MW**: peso molecular de la secuencia proteica informada [kDa]; **Score**: puntaje asignado a la identificación de la proteína informada.

Accession	Description	Coverage	Peptides	PSMs	Unique Peptides	AAs	MW	Score	FP 4	FP 5	FP 6
I1KMG7	Expansin OS=Glycine max OX=3847 GN=10077	13	2	3	2	248	26,5	10,56	-	X	-
I1K7H3	Expansin OS=Glycine max OX=3847 GN=10079	19	5	9	3	255	27,4	23,42	X	X	X
I1JWT8	Expansin OS=Glycine max OX=3847 GN=10080	16	2	2	1	248	26,7	5,85	-	X	-
K7MKX0	Expansin OS=Glycine max OX=3847 GN=10081	11	2	5	2	267	28,8	16,57	-	X	X
V6CKR0	Expansin OS=Glycine max OX=3847 GN=exp1	16	3	6	1	255	27,5	20,48	-	X	-
AOAOR0JDM2	Expansin OS=Glycine max OX=3847 GN=GLYM	12	2	3	1	258	27,8	8,25	-	X	-
K7N161	Expansin OS=Glycine max OX=3847 GN=GLYM	12	2	3	2	265	28,7	10,94	-	X	-
I1MST0	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	10	2	3	1	293	33	7,8	-	X	-
AOAOR0GVM5	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	19	4	5	3	287	32,3	13,16	-	X	-
K7MVG8	Endo-1,3(4)-beta-glucanase OS=Glycine max	4	3	4	2	737	82,7	10,84	-	X	-
I1N4K3	Endo-1,3(4)-beta-glucanase OS=Glycine max	36	20	31	10	655	73,7	96,85	-	X	X
I1KWF3	Endo-1,3(4)-beta-glucanase OS=Glycine max	38	20	35	10	653	73,4	108,79	X	X	X
AOAOR0ICF9	Pectinesterase OS=Glycine max OX=3847 GN=	16	3	7	3	316	35,4	22,08	-	X	X
I1JKR6	Pectinesterase OS=Glycine max OX=3847 GN=	6	2	2	2	490	54,4	6,46	-	X	-
K7MZI8	Pectinesterase OS=Glycine max OX=3847 GN=	15	8	12	8	615	67,9	32,45	X	X	X
I1JAV9	Pectinesterase OS=Glycine max OX=3847 GN=	19	6	10	6	553	61	30,62	X	X	X

## DISCUSIÓN

Los resultados de la presente tesina abordaron la germinación de ejes embrionales (E) de soja desde el punto de vista proteómico. En particular, se evaluó la dinámica de imbibición durante el proceso bajo condiciones propicias e inhibitorias. Se logró identificar la ventana de tiempo en la cual se sintetizan las proteínas mínimas necesarias para completar la germinación. Al mismo tiempo se relacionó con la ventana de acción del ácido abscísico (ABA), el cual constituye el principal inhibidor de la germinación en soja, infiriendo así un posible control proteico por parte de la hormona. Estos resultados fueron utilizados a su vez para ubicar el tiempo de incubación en donde se presentan los eventos tempranos que definen la germinación e identificar el protocolo de extracción más adecuado en términos del perfil proteico más representativo de dicho momento. En este sentido, se focalizó la atención en proteínas cuya función primaria está vinculada al debilitamiento, relajación y remodelamiento de pared celular implicadas en los eventos de expansión en vegetales.

### **Ensayos de germinación en condiciones propicias e inhibitorias**

Considerando que la germinación de las semillas es un proceso netamente expansivo, conducido por la absorción de agua y que no implica división celular (Bewley *et al.*, 2013), el estudio de la dinámica de ganancia de agua sobre ejes embrionales de soja permitió evaluar el proceso para condiciones tanto propicias como inhibitorias.

La incubación en agua destilada a  $27 \pm 1$  °C y oscuridad resultó propicia para la germinación de E de soja maduros y secos (Fig. 8). Bajo estas condiciones, los E absorbieron agua rápidamente finalizando la fase I de imbibición en sólo dos horas, permaneciendo a continuación en fase II, sin experimentar una ganancia neta sustancial de agua, hasta aproximadamente las nueve a diez horas de incubación. A partir de este momento, los E comenzaron a absorber nuevamente agua, marcando el inicio de la fase III (germinación *sensu stricto*) y manifestándose visiblemente alargados luego de las 12 h de incubación aproximadamente.

La energía libre expresada como potencial agua ( $\Psi_a$ ) es uno de los factores más importantes que determinará el movimiento de agua desde el medio de incubación hacia la semilla (Bewley *et al.*, 2013). De acuerdo a ello, la incubación de E de soja en un medio de bajo potencial agua (Polietilenglicol 8000;  $\Psi_a = -1$  MPa) demostró que la limitación en el ingreso de agua al interior de las células de la zona de elongación (ZE) de los E no permitió generar la presión de turgencia necesaria para la expansión y el alargamiento celular, evitando el inicio de la fase III de imbibición, o más específicamente, de la germinación en

sentido estricto (Fig. 10). Un estudio anterior (Montechiarini, 2018) mostró que al aumentar el  $\Psi_a$  de la solución de PEG por encima de -1 MPa ( $\Psi_a = -0,125; -0,25$  y  $-0,5$  MPa) se logró alcanzar hasta el 100% de la germinación de los E de soja, aunque con una tasa de ganancia de agua menor que bajo condiciones propicias en agua destilada ( $\Psi_a = 0$  MPa). Adicionalmente, estos resultados también coincidieron en que, si bien los E absorbieron agua durante la fase I de imbibición (producto de la gran diferencia de  $\Psi_a$  entre los E altamente deshidratados y el medio de incubación), lo hicieron más lentamente y en menor proporción respecto al control en agua, tal como se muestra en la Fig. 8.

Por otro lado, la germinación también puede ser controlada bajo condiciones que restrinjan o eviten el remodelamiento de paredes celulares necesario para completar la expansión de las células de la ZE. Entre ellas, la hormona vegetal ácido abscísico es el inhibidor fisiológico de germinación de semillas más estudiado (Bewley y Black, 1994; Kermodé, 2005; Bradford y Nonogaki, 2007; Bewley *et al.*, 2013). En el presente trabajo, la incubación de E de soja en solución 100  $\mu$ M de ABA no alteró la fase I respecto al control en agua, en tanto mantuvo a los E en fase II sin iniciar la fase III evitando el alargamiento celular compatible con la germinación (Fig. 11). Estos resultados estuvieron de acuerdo con los obtenidos por Montechiarini *et al.* (2020) en soja y por Schopfer y Plachy (1984) en semillas de colza (*Brassica napus*), llegando estos últimos a la conclusión que el ABA no estaría impidiendo el ingreso de agua, sino que provocaría un cambio más sustancial dentro de la semilla. Por otro lado, Lado *et al.* (1975) estudiaron la relación positiva entre la acidificación de la membrana y la germinación en semillas de rábano (*Raphanus sativus*) y maíz (*Zea mays*). Descubrieron que en presencia de ABA el normal flujo de protones que involucra la secreción de  $H^+$  y la acumulación de  $K^+$  se ve contrarrestada, evitando la acidificación del medio y la germinación. En soja, se ha establecido para el ABA un rol inhibitorio de la germinación asociado a un efecto represor sobre la expresión del transcripto de la expansina *EXP1*, sugiriendo además la posibilidad de un control adicional por ABA, aún no evaluado, aguas abajo del transcripto (Montechiarini *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta que las expansinas, indicadas como promotoras primarias responsables del remodelamiento de paredes celulares, operan a pH ácido (McQueen-Mason *et al.*, 1992; Cosgrove, 2000), el control del pH podría ser, por lo tanto, el mecanismo adicional por el cuál actúa el ABA evitando la plasticidad de la pared celular y consecuentemente la germinación. La relación inversa entre el ABA y la síntesis *de novo* de *EXP1* se identificó también en soja durante el desarrollo, resultando en la acumulación del transcripto a medida que desciende naturalmente con la edad el contenido de ABA endógeno en los E de estas semillas (Montechiarini *et al.*, 2022). Estos resultados también confirmaron a *EXP1* como parte del

pool de ARNm de larga vida, los cuales, se postula, serían suficientes para llevar a cabo la germinación (Rajjou *et al.*, 2004; Sano *et al.*, 2012). En este sentido, estudios realizados con  $\alpha$ -amanitina (inhibidor de la transcripción) han demostrado que, aunque la germinación de embriones de trigo resultó inhibida aún en bajas concentraciones (Jendrisak, 1980), la misma fue posible en Arabidopsis y soja a partir de estos ARNm de reserva, sin necesidad de la transcripción *de novo* (Rajjou *et al.*, 2004; Montechiarini, 2018). No obstante, la incubación de E de soja en 100  $\mu$ M de cicloheximida (inhibidor de la traducción) evidenció que, al igual que en ABA, no hubo limitación hídrica en las primeras dos fases de imbibición, ya que se alcanzaron valores similares al tratamiento control, por lo que otras serían las limitaciones presentes que evitaron la transición a la fase III de la curva de imbibición (Fig. 12 y 8). Se reafirman así los resultados en Arabidopsis (Rajjou *et al.*, 2004) y soja (Montechiarini, 2018) respecto al bloqueo de la germinación y la necesidad de la traducción de al menos los ARNm de larga vida para completar el proceso.

### **Reversión a la germinación luego de inhibición en PEG o ácido abscísico**

Para las condiciones de incubación inhibitorias de la germinación en PEG o ABA analizadas previamente, se encontró que, luego de transferir los E a condiciones propicias de germinación en agua, el efecto inhibitor quedó suprimido en ambos casos y los E lograron reiniciar el ingreso de agua y elongarse. Sin embargo, la reanudación de la absorción de agua ocurrió a ritmos distintos, sugiriendo un modo de acción diferente en cada caso. Luego de la incubación en PEG, la eliminación de dicho medio permitió una reabsorción de agua casi inmediata (Fig. 13), en tanto se requirieron más de diez horas de incubación en agua luego de la transferencia desde la condición inhibitoria en ABA. Al respecto, Montechiarini *et al.* (2020) atribuyeron estas diferencias a que el nivel de expresión de *EXP1* resultó *up* y *down* regulada bajo incubación en PEG y ABA, respectivamente. La acumulación de *EXP1* durante la incubación de los E en PEG podría explicar el rápido reinicio de la absorción de agua luego de la transferencia. Por otro lado, Gimeno-Gilles *et al.* (2009) informaron que, en semillas de *Medicago truncatula*, la presencia de ABA inhibió la expresión de genes asociados a enzimas relacionadas con el debilitamiento y expansión de la pared celular y con la síntesis de constituyentes de pared celular. Estos antecedentes proporcionan entonces posibles respuestas a por qué los E preincubados en ABA necesitaron un tiempo de incubación mayor en agua para revertir el efecto represor dando lugar a una germinación más lenta (Fig. 13). Adicionalmente, en el presente trabajo se encontró que la tasa de absorción en fase III luego de la transferencia a agua fue mayor, aunque no significativa, para los E previamente incubados en PEG ( $0,5357 \mu\text{LH}_2\text{O}\cdot\text{E}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) que para aquellos

incubados en ABA ( $0,4558 \mu\text{LH}_2\text{O.E}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), en tanto resultó significativamente mayor para ambos casos respecto a la pendiente en fase III correspondiente a la condición control en agua destilada ( $0,2167 \mu\text{LH}_2\text{O.E}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Estos resultados reforzaron la hipótesis de mecanismos de acción diferentes para el control osmótico y hormonal al tiempo que, permitieron proponer a las soluciones de PEG y ABA para el tratamiento de osmo y hormo priming en soja, respectivamente (Montechiarini *et al.*, 2021).

### **Tiempo de acción de proteínas mínimas de germinación: incubación de ejes embrionales aislados sometidos a transferencias recíprocas Agua - Cicloheximida**

La dinámica de transferencia Agua-Cicloheximida (Fig. 14) mostró que el tiempo de incubación previo en agua que necesitó un eje embrional para sintetizar las proteínas mínimas necesarias para la expansión celular y germinar fue de al menos seis horas. A partir de ese momento, la transferencia e incubación en cicloheximida no tuvo efecto represor, permitiendo continuar con la absorción de agua y completar la germinación. Un resultado similar se encontró para el ABA, habiéndose identificado la ventana de tiempo de respuesta a la hormona dentro de las primeras seis horas de incubación previa en agua. Dentro de esta ventana de tiempo se ubica además el efecto represor del ABA sobre la expresión de *EXP1*. A partir de ese momento, tanto la expresión de *EXP1* como la germinación pierden su sensibilidad y proceden aún en presencia de ABA en el medio (Montechiarini *et al.*, 2020).

Además del control transcripcional sobre *EXP1* en soja, otras biomoléculas y/o procesos metabólicos podrían ser blancos de acción para el ABA en su rol inhibitorio de la germinación. En *Medicago truncatula* la expresión de los genes que codifican enzimas asociadas al debilitamiento y expansión de pared celular y a la síntesis de los constituyentes de pared, entre los que se encuentran  $\alpha$ -expansinas, pectinmetilesterasas, celulosa sintasa, extensinas y xiloglucano endotransglicosilasa, fueron inhibidos en presencia de ABA (Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). La ventana de tiempo para sintetizar las proteínas mínimas necesarias para la germinación en E de soja coincide con la ventana de respuesta al ABA, sugiriendo que la hormona podría estar afectando la expresión génica no solo a nivel transcripcional sino también aguas abajo del transcripto, ya sea a través de la traducción y/o en su modo de acción.

## **Identificación y caracterización del perfil proteómico de germinación de ejes embrionales de soja**

Al iniciar la imbibición de una semilla madura y seca, cada uno de los tejidos y las células comienzan a rehidratarse y reactivar el metabolismo que hasta ese entonces se encontraba latente (Bewley *et al.*, 2013). El abordaje molecular de la tesina se enfocó en describir los eventos predominantes que tienen lugar durante la incubación de ejes embrionales de soja en agua destilada estéril, así como identificar un protocolo de extracción adecuado en términos del perfil proteómico involucrado en los eventos moleculares tempranos que definen la germinación. Estos resultados constituirán además el puntapié inicial para el posterior estudio cuantitativo diferencial del perfil proteómico en condiciones propicias e inhibitorias del proceso.

### **Tiempo de definición de los eventos tempranos de germinación**

Uno de los primeros procesos que tiene lugar en una semilla al embeberse es la respiración, necesaria para la producción de energía e intermediarios del metabolismo, así como la activación de enzimas y procesos necesarios para sustentar la germinación (Bewley *et al.*, 2013). En esta etapa la energía y las proteínas sintetizadas podrían estar destinadas a las diferentes actividades metabólicas tales como catalíticas, reparación de ADN y de membranas, cadena respiratoria, traducción y degradación de sustancias de reserva (Bewley, 1997; Matilla, 2008). En este sentido, los resultados de la presente tesina mostraron que, en líneas generales, en el perfil proteómico de los ejes embrionales luego de 12 h de incubación en agua, predominaron procesos asociados a respuesta a estímulos, mecanismos de señalización, comunicación y transducción de señales que estarían afectando la expresión génica y gatillando el desarrollo y establecimiento de estructuras anatómicas. También se identificaron proteínas relacionadas a la replicación del ADN y la división celular, los cuales, de acuerdo con la naturaleza netamente expansiva que define la germinación, son considerados post-germinativos (Nonogaki *et al.*, 2010). Por otro lado, para E incubados por nueve horas, las proteínas totales encontradas en las fracciones proteicas secuenciales (FP 1, 2 y 3), se correspondieron en su mayoría con el metabolismo primario, entre ellos la respiración, la traducción, la localización de proteínas y el catabolismo de sustancias de reserva.

Un trabajo realizado en semillas de tomate, mostró que grupos de genes asociados al desarrollo (proteínas de reserva, maduración/desecación y biosíntesis de lípidos de reserva), disminuyeron su expresión a lo largo de la imbibición de las semillas, en tanto

aquellos vinculados a la hidrólisis de pared celular (endo-1,3(4)-beta-glucanasa y xyloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa) mostraron un aumento progresivo a lo largo de la imbibición, y los de expansión celular (expansinas) aumentaron a lo largo de la incubación hasta alcanzar un pico, luego del cual empezaron a disminuir (Machado, 2007, citado en Bewley *et al.*, 2013). El pico de expresión de genes asociados a la expansión de pared celular en semillas de tomate, ocurrió al momento en que las semillas comenzaban a germinar, e incluso antes. De manera similar, Montechiarini *et al.* (2020) informaron que la expresión de *EXP1* durante la germinación de E de soja se incrementó de forma creciente durante la incubación, registrándose el pico máximo de expresión alrededor de las ocho horas de incubación. Estos antecedentes sugieren, por lo tanto, que previo a la ocurrencia de la protrusión radicular se presentaría el tiempo de incubación más apropiado para describir los eventos moleculares tempranos que definen la germinación, soportando, por lo tanto, la utilización de E de soja incubados por nueve horas preferentemente a los incubados por 12 h para los estudios moleculares que dan lugar a la germinación. Los resultados moleculares coincidieron además con los estudios fisiológicos de germinación que ubicaron el inicio de fase III de imbibición alrededor de las nueve horas de incubación, en tanto se correspondieron con E en plena fase III, visiblemente elongados, a las 12 h (Fig. 8).

### **Análisis de protocolos de extracción proteica**

Durante todo el proceso germinativo parecen encontrarse proteínas como peptidasas, amilasas, lipasas y fosfatasas posiblemente asociadas a procesos catabólicos de sustancias de reserva, liberando compuestos de menor peso molecular para ser movilizados y sustentar al eje embrional en crecimiento o incluso a las plántulas jóvenes (Correa, 1974; Matilla, 2008; Han *et al.*, 2013). Adicionalmente, los eventos tempranos que definen la germinación implican la necesidad del remodelamiento de las paredes celulares de las células de la ZE (Sliwinska *et al.*, 2009; Montechiarini *et al.*, 2020), acompañando el ingreso de agua al interior de las mismas y completando así el proceso expansivo. Las proteínas de pared celular pueden estar adheridas a la matriz de microfibrillas mediante enlaces covalentes y no covalentes, lo que justificó el empleo de diferentes protocolos de extracción proteicos (de pared y totales) que permitieran alterar los distintos tipos de enlaces presentes. En todos los protocolos se partió del tejido vegetal específico (ZE de E de soja) pulverizado en nitrógeno líquido para reducir el tamaño de las partículas y facilitar la extracción de proteínas, por lo que las diferencias en los perfiles proteómicos obtenidos se deberían preferentemente al buffer de extracción utilizado en cada caso. No obstante, la

extracción de las proteínas de pared celular presenta dificultades inherentes a la estructura de la pared y su composición que complican el aislamiento de las mismas respecto de los rendimientos obtenidos para otros compartimentos subcelulares (Feiz *et al.*, 2006). Tal como fue reportado por Chivasa *et al.* (2002), la extracción con cloruro de calcio se utilizó para obtener proteínas unidas iónicamente a la pared, mientras que el buffer urea para extraer en mayor medida proteínas unidas covalentemente a la pared celular. Sin embargo, la urea además interfiere en las interacciones intermoleculares no covalentes debilitando el efecto hidrofóbico de las proteínas y logrando una mayor solubilización de las mismas (Santos, 2009; Echeverri *et al.*, 2010). Por su parte, el cloruro de litio permitió seleccionar compuestos solubles que están adheridos iónicamente a la pared (Melan y Cosgrove, 1988; Voigt y Frank, 2003) especialmente glicoproteínas (Feiz *et al.*, 2006). El uso de detergentes (SDS y CHAPS) junto con agentes caotrópicos (urea, tiourea) genera una acción sinérgica, especialmente el SDS tiene una gran capacidad de unirse a las proteínas evitando la formación de enlaces hidrofóbicos con los componentes celulares y formando complejos solubles en solución acuosa (Molloy, 2000).

En el presente trabajo, las extracciones con cloruro de calcio y cloruro de litio (FP 1 y 2) obtuvieron una menor cantidad total de proteínas en comparación con las demás extracciones, posiblemente debido a su naturaleza menos astringente de extracción de proteínas retenidas débilmente a la pared celular. Mientras tanto, para las extracciones que recurrieron al uso de agentes caotrópicos y/o detergentes (FP 3 y 4), las colas hidrofóbicas del detergente pudieron introducirse a través de la bicapa lipídica de la membrana, unirse a los residuos hidrofóbicos de las proteínas y solubilizarlas, lo que explicaría la mayor presencia de proteínas en ambas fracciones respecto a las FP 1 y 2.

El buffer de extracción conteniendo cloruro de sodio (FP 5) solubiliza a las proteínas por acción de la fuerza iónica. Éste aparentemente sería más selectivo para la extracción de proteínas unidas mediante interacciones electrostáticas (Dueñas Gómez *et al.*, 2008; Carabalí Miranda *et al.*, 2009) y pareciera, por lo tanto, ser el indicado para conseguir una mayor cantidad de proteínas de interés. Por otro lado, los resultados de localización celular de las proteínas extraídas indicaron que, las fracciones correspondientes a FP 1, 2, 3, 4 y 5 presentaron gran cantidad de proteínas contaminantes, correspondientes en mayor proporción a orgánulos, ubicando recién en tercer lugar (o segundo en la FP 4) a aquellas pertenecientes al espacio extracelular, que eran el principal objetivo de los protocolos seleccionados (Feiz *et al.*, 2006). (Feiz *et al.*, 2006).

Finalmente, la extracción de proteínas totales con fenol-TRIS (FP 6) permitió disolver las proteínas en fenol y separarlas de sustancias como lípidos, polisacáridos, compuestos fenólicos y ácidos nucleicos (Wang *et al.*, 2008; López Quimbayo, 2012). Acompañado

luego de una precipitación con acetato de amonio en metanol, parece ser también un método efectivo para obtener un elevado número de proteínas.

### **Selección del protocolo de extracción de proteínas de expansión celular**

La comparación de perfiles proteómicos obtenidos en E de soja incubados durante 12 y nueve horas (FP 1, 2 Y 3) en condiciones de germinación llevó a considerar la incubación de nueve horas en agua destilada estéril como la opción más viable para el posterior estudio de proteínas intervinientes en procesos tempranos que inducen la germinación. Esto fue posible a partir del conocimiento que ambos protocolos para nueve y 12 de incubación permitieron describir de manera general los eventos temporales relacionados al proceso de germinación como pre y pos germinativos, respectivamente. Sin embargo, desde el punto de vista metodológico, la elección de estos protocolos parecería no haber sido la adecuada para al objetivo primario de estudio. Esto de algún modo refleja la complejidad enorme asociada a la germinación de semillas. Se trata, ni más ni menos, de un individuo en miniatura, contenido en una diminuta semilla, poniendo en marcha toda su maquinaria y desarrollando a pleno su máximo potencial para garantizar el éxito de su propia vida y, con esto, de su propia especie. Parece razonable, por lo tanto, que la cantidad total de proteínas identificadas a partir del aislamiento secuencial en nueve horas (1.094) incluso se incremente notablemente con tan sólo tres horas adicionales de incubación en los E de 12 h (2.673). Sin embargo, aún a pesar de la gran cantidad de proteínas identificadas, en ninguno de los casos se logró el aislamiento de proteínas de remodelamiento de pared celulares, soportando así no sólo la complejidad del proceso en general, sino también la de encontrar aquellas proteínas específicamente vinculadas a la expansión celular que actúan inicialmente definiendo el proceso.

Por esta razón, para E incubados nueve horas se pusieron a prueba otros protocolos con diferentes objetivos de extracción, de acuerdo al tipo de interacción y el grado de retención de las proteínas dentro de las células. La clasificación por ontología génica para las categorías funcionales enriquecidas mostró que, en términos generales y al igual que ocurrió para el protocolo secuencial de E incubados nueve horas (FP 1, 2 y 3), en los extractos correspondientes a las FP 4, 5 y 6 (Tabla 2) se encontraron proteínas vinculadas a los eventos tempranos de la germinación. Adicionalmente, se encontraron proteínas asociadas a la pared celular, reafirmando la elección del tiempo de incubación de nueve horas y postulando estos protocolos alternativos para el estudio de las proteínas que intervienen en los eventos tempranos que impulsan la germinación. En los tres extractos, las proteínas resultaron en su gran mayoría de localización en orgánulos, seguido en mucha

menor proporción por la localización citosólica, de espacio extracelular y de membrana (Fig. 17). Resultaron además compartidas en las tres fracciones 778 proteínas, en tanto 132, 1.314 y 147 resultaron exclusivas de las FP 4, 5 y 6, sobre un total de 1.098, 2.984 y 1.699 proteínas, respectivamente.

Adicionalmente, los datos crudos obtenidos a partir de la base de datos de UniProt identificaron proteínas expansinas reportadas como responsables del ablandamiento y extensión de pared celular; así como xiloglucano endotransglucosilasas/hidrolasas, endoglucanasas y pectinesterasa, encargadas de su modificación y reorganización. Las vías GO identificadas para los ID de estas proteínas correspondieron a procesos biológicos de organización y modificación de pared celular y a componentes celulares de pared celular y del espacio extracelular. En base a estos resultados, la FP 5 permitió el aislamiento del mayor número de proteínas totales. Se identificaron además en este extracto siete expansinas, cuatro de ellas de manera exclusiva, y entre éstas, a su vez, *EXP1* (V6CKR0), cuyo transcripto fue previamente identificado por Montechiarini *et al.* (2020) en el mismo tejido vegetal (ZE del E) y durante el mismo proceso fisiológico. Se encontraron además dos xiloglucano endotrasnglucosilasa/hidrolasas, cuatro pectina-esterasa y tres endo-1,3(4)-beta-glucanasa, las cuales resultaron aunque no en su totalidad compartidas con las identificadas en las FP 4 y 6 (Tabla 3). Estos resultados permitieron, por lo tanto, postular el protocolo de extracción propuesto por McQueen-Mason *et al.* (1992) para hipocótilos de pepino (protocolo 4), como el más adecuado para la obtención de extractos enriquecidos en proteínas vinculadas a los procesos de expansión de pared celular y eventos tempranos que definen la germinación en E de soja (FP 5). Asimismo, se propone la utilización futura de este protocolo para el estudio comparativo del perfil proteómico diferencial en condiciones propicias de germinación e inhibitorias por ABA.

## CONCLUSIÓN

- La incubación de ejes embrionales de soja en agua destilada presentó una curva trifásica típica de absorción de agua observada en semillas enteras. Mientras que, la incubación en presencia de Polietilenglicol 8000 (PEG), ácido abscísico (ABA) y cicloheximida impidió la transición de la fase II a la fase III, viéndose completamente inhibida la germinación. Para todos los casos se planteó un modo de acción diferencial. En el primero (PEG), la limitante principal sería hídrica, marcada por la diferencia de potencial agua, la cual habría evitado el desarrollo del potencial de turgencia necesario para la germinación. Para los dos tratamientos restantes operaría un control sobre las biomoléculas responsables de la germinación. La cicloheximida inhibiría la germinación a través de su efecto inhibitorio del proceso de traducción proteica; en tanto el ABA, según datos previos, sería responsable al menos en parte del control transcripcional de expresión de las proteínas implicadas en el proceso de remodelación de paredes celulares, restringiendo así la expansión celular que conduce a la germinación.
- El tiempo de incubación en agua requerido por un eje embrional para sintetizar las proteínas mínimas necesarias para la expansión celular y germinar sería de, al menos, seis horas. Aún luego de cinco horas de imbibición inicial en agua, la cicloheximida fue capaz de impedir la germinación de los ejes embrionales. Luego de seis o más horas en agua, la cicloheximida perdió su efecto represor. Esta ventana de síntesis de proteínas mínimas necesarias para la germinación de E de soja coincidió con la ventana de respuesta al ABA previamente identificada, fortaleciendo la hipótesis que la hormona podría estar afectando la expresión génica no solo a nivel transcripcional sino también aguas abajo, ya sea a través de la traducción y/o en el modo de acción de las proteínas.
- El tiempo de incubación más apropiado para describir los eventos moleculares tempranos que definen la germinación desde el punto de vista proteómico se estableció a las nueve horas, frente una incubación de 12 horas en donde se vieron representados eventos preferentemente post-germinativos.
- La extracción de proteínas bajo el protocolo propuesto por McQueen-Mason *et al.* (1992) para hipocótilos de pepino no solo permitió obtener mayor cantidad de proteínas totales y exclusivas, sino permitió además la obtención de proteínas específicas vinculadas a los eventos tempranos de expansión de pared celular que definen la germinación en E de soja, postulando a este protocolo como el más

conveniente para el posterior estudio comparativo del perfil proteómico en condiciones propicias e inhibitorias del proceso.

*Los resultados de esta tesina contribuyen al conocimiento del proceso germinativo desde el punto de vista proteómico en semillas de soja; constituyendo la base para el posterior estudio cuantitativo diferencial de expresión del perfil proteómico en condiciones propicias de germinación e inhibitorias por ABA.*

## BIBLIOGRAFÍA

Baskin CC, Baskin JM. 1998. Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego, California. Academic Press. p. 666.

Belliény-Rabelo D, De Oliveira EAG, Da Silva Ribeiro E, Costa EP, Oliveira AEA, Venancio TM. 2016. Transcriptome analysis uncovers key regulatory and metabolic aspects of soybean embryonic axes during germination. *Scientific Reports* 6(36009): 1-12. DOI: 10.1038/srep36009

Bereke T. 2018. Biology of seed development and germination physiology. *Advances in Plants and Agriculture Research* 8(4): 336–346. DOI: 10.15406/apar.2018.08.00336

Bewley JD, Black M. 1994. SEEDS: Physiology of Development and Germination. 2da Edición. Nueva York. Editorial Springer. p. 445.

Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. 2013. Seeds: Physiology of development, germination and dormancy. 3ra Edición. New York, Estados Unidos. Editorial Springer. p. 392. DOI: 10.1007/978-1-4614-4693-4

Bewley JD. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.

Bolsa de Comercio de Rosario. 2022. Estimaciones Nacionales de Producción. <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/gea/estimaciones-nacionales-de-produccion/estimaciones>. Acceso: 25 de mayo de 2022.

Bradford KJ, Nonogaki H. 2007. Seed Development, Dormancy and Germination. Oxford, UK. Blackwell Publishing Ltd. p. 367. DOI: 10.1002/9780470988848

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Carabalí Miranda IL, Cuenca CEN, Sánchez LPR. 2009. Extracción y medida de actividad de pectin metil estearasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), enzima relacionada con el ablandamiento. *Acta Biológica Colombiana* 14(2): 73-82.

Carrao Panizzi MC, Gontijo Mandarino JM. 1995. Botánica. En: Centro Nacional de Investigación sobre la Soja (Ed.) *El Cultivo de la Soja en Los Trópicos: Mejoramiento Y Producción*. Roma, Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. p. 1-12.

- Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Robertson D, Yu XL, Knox JP, Bolwell P, Slabas AR. 2002. Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis* 23: 1754-1765. DOI: 10.1002/1522-2683(200206)23:11<1754::AID-ELPS1754>3.0.CO;2-E
- Correa VJ. 1974. El proceso de la germinación. En: Díaz TT, Jara LF (Eds.) Seminario-Taller sobre investigaciones en semillas forestales tropicales. Colombia. Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal. p. 95-100. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/30666>
- Cosgrove DJ. 1993. Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *New Phytologist* 124(46): 1-23.
- Cosgrove DJ. 1997. Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell* 9: 1031-1041.
- Cosgrove DJ. 1998. Cell Wall Loosening by Expansins. *Plant Physiology* 118: 333–339.
- Cosgrove DJ. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326.
- Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell Wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 850-861.
- Cosgrove DJ. 2014a. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Current Opinion in Plant Biology* 22: 122–131. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.11.001 1369-5266
- Cosgrove DJ. 2014b. Plant Cell Growth and Elongation. eLS. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001688.pub2
- Cosgrove JD. 2016. Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall modifying enzymes. *Journal of Experimental Botany* 67(2): 463–476.
- Dueñas Gómez YM, Cuenca CEN, Sánchez LPR. 2008. Búsqueda de las mejores condiciones para la extracción y medida de actividad de celulasa y xilanas extraídas de la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). *Acta Biológica Colombiana* 13(1): 217-228.
- Echeverri NP, Ortiz BL, Caminos JE. 2010. Análisis proteómico de cultivos primarios de troides. *Revista Colombiana de Química* 39(3): 343-358.

- Feiz L, Irshad M, Pont-Lezica RF, Canut H, Jamet E. 2006. Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Methods* 2(10): 1-13. DOI: 10.1186/1746-4811-2-10
- Fry SC. 2004. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist* 161: 641–675. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2003.00980.x
- Gazzoni DL. 1995. La soja como alimento humano: calidad nutritiva, procesamiento y utilización. En: Centro Nacional de Investigación sobre la Soja (Ed.) *El Cultivo de la Soja en Los Trópicos: Mejoramiento Y Producción*. Roma, Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. p. 241-254.
- Gimeno-Gilles C, Lelièvre E, Viau L, Malik-Ghulam M, Ricoult C, Niebel A, Leduc N, Limami AM. 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): 108-119.
- Gosparini CO, Busilacchi HA, Vernieri P, Morandi EN. 2007. Endogenous abscisic acid and precocious germination of developing soybean seeds. *Seed Science Research* 17: 165-174. DOI: 10.1017/S0960258507785872
- Gutiérrez HF. 2020. Botánica sistemática de las plantas con semillas. Santa Fe. Editorial Universidad Nacional del Litoral. p. 210. [https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/5567/botanica1\\_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/5567/botanica1_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Han C, Yin X, He D, 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): e56947. DOI: 10.1371/journal.pone.0056947
- Hilhorst HWM. 1995. A critical update on seed dormancy .I. Primary dormancy. *Seed Science Research* 5: 61-73.
- Hymowitz T. 1970. On the Domestication of the Soybean. *Economic Botany* 24(4): 408-421. <https://www.jstor.org/stable/4253176>
- Jendrisak J. 1980. The Use of  $\alpha$ -Amanitin to Inhibit in Vivo RNA Synthesis and Germination in Wheat Embryos. *The Journal of Biological Chemistry* 255(18): 8529-8533.
- Kermode AR. 2005. Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 319-344. DOI: 10.1007/s00344-005-0110-2

- Kumudini S. 2010. Soybean growth and development. En: Singh G. (Ed.) The soybean: Botany, production and uses. Oxfordshire, UK. CABI Publishing. p. 48-73.
- Lado P, Rasi-Caldogno F, Colombo R. 1975. Acidification of the Medium Associated with Normal and Fusicoccin-Induced Seed Germination. *Physiology Plant* 34: 359-364.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leonardi GA, Carlos NA, Mazzafera P, Balbuena TS. 2015. *Eucalyptus urograndis* stem proteome is responsive to short-term cold stress. *Genetics and Molecular Biology* 38(2): 191-198. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738220140235>
- Lerouxel O, Cavalier DM, Liepman AH, Keegstra K. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 621–630. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.09.009
- Leubner G. 2022. Seed Structure and Anatomy. The Seed Biology Place. <http://seedbiology.de/structure.asp>. Acceso: 25 de mayo de 2022.
- Link AJ, LaBaer J. 2009. In-Gel Trypsin Digest of Gel-Fractionated Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols* 4(2): 1-4. DOI: 10.1101/pdb.prot5110
- López Quimbayo LD. 2012. Extracción de proteínas a partir de hojas y semillas de *Pentacalia nítida* y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico acuoso. Tesina Licenciatura en Microbiología Industrial. Universidad Javeriana, Bogotá.
- Matilla AJ. 2008. Desarrollo y Germinación de las Semillas. En: Azcón-Bieto J, Talón M (Eds.) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2<sup>da</sup> Edición. Madrid, España. McGRAW HILL. p. 537-558.
- McQueen-Mason SJ, Cosgrove DJ. 1995. Expansin Mode of Action on Cell Walls: Analysis of Wall Hydrolysis, Stress Relaxation, and Binding. *Plant Physiology* 107: 87-100.
- McQueen-Mason SJ, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1992. Two Endogenous Proteins That Induce Cell Wall Extension in Plants. *The Plant Cell* 4: 1425-1433.
- Megías M, Molist P, Pombal MA. 2021. Matriz extracelular. <https://atlashistologia.webs7.uvigo.es/pdfs-descargas/atlas-celula-02-matriz-extracelular.pdf>. Acceso: 15 de septiembre de 2021.

Melan MA, Cosgrove DJ. 1988. Evidence Against the Involvement of Ionically Bound Cell Wall Proteins in Pea Epicotyl Growth. *Plant Physiology* 86(2): 469-474. DOI: 10.1104/pp.86.2.469

Miedes E, Zarra I, Hoson T, Herbers K, Sonnewald U, Lorences EP. 2011. Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility. *Journal of Plant Physiology* 168(3): 196-203. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.06.029

Molist P, Pombal MA, Megías M. 2011. Matriz extracelular. <http://azolla.fc.ul.pt/aulas/documents/atlas-celula-02-matriz-extracelular.pdf>. Acceso: 15 de septiembre de 2021.

Molloy MP. 2000. Two-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins Using Immobilized pH Gradients. *Analytical Biochemistry* 280: 1-10. DOI: 10.1006/abio.2000.4514

Montechiarini NH. 2009. Rol del ABA en la regulación del reinicio del crecimiento de ejes embrionales inmaduros de soja. Tesina Licenciatura en Biotecnología. Universidad Nacional de Rosario.

Montechiarini NH. 2018. Regulación de la expresión del programa de germinación en semillas de soja. Doctorado en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Disponible en: <https://rehip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/17760/Tesis%20Doctorado%20Montechiarini.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Montechiarini NH, Delgado L, Morandi EN, Carrillo NJ, Gosparini CO. 2020. The expansin *EXP1* gene in the elongation zone is induced during soybean embryonic axis germination and differentially expressed in response to ABA and PEG treatments. *Seed Science Research* 31(1): 60-68. DOI: 10.1017/S0960258520000379

Montechiarini NH, Morandi EN, Gosparini, CO. 2022. Developing soybean seed germination: low ABA and high *EXP1* gene expression promote embryonic axis growth whereas the seed coat delays radicle protrusión. *Seed Science Research* 32(1): 23-33. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258522000022>

Montechiarini NH, Quijano Á, Morandi EN, Yordán E, Gosparini CO. 2021. Osmo- and hormo-priming in soybean embryonic axes. *BIOCELL* 45 (2): A24. ISSN 1667-5746.

Niklas KJ. 1992. *Plant Biomechanics: An Engineering Approach to Plant Form and Function*. Chicago, Estados Unidos. The University of Chicago Press. p. 607.

- Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD. 2010. Germination-Still a mystery. *Plant Science* 179: 574–581. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.02.010
- Organización Mundial de Conservación. 2014. El Crecimiento de la Soja: Impactos y Soluciones. Gland, Suiza. WWF. p. 96. [http://awsassets.panda.org/downloads/reporte\\_final\\_soja\\_esp\\_2.pdf](http://awsassets.panda.org/downloads/reporte_final_soja_esp_2.pdf)
- Purugganan MM, Braam J, Fry SC. 1997. The Arabidopsis TCH4 Xyloglucan Endotransglycosylase. *Plant Physiology* 115: 181-190.
- Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, 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: 1598–1613.
- Rodríguez Zurro T, Terré E. 2022. Proyección de exportaciones de los principales productos agroindustriales. Bolsa de Comercio de Rosario. <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/panorama-de-mercados-bcr/noticias-informe-panorama-de-35>
- Sampedro J, Cosgrove DJ. 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology* 6(12): 242.2-242.11. DOI: 10.1186/gb-2005-6-12-242
- Sangi S, Santos MLC, Alexandrino CR, Da Cunha M, Coelho FS, Ribeiro GP, Lenz D, Ballesteros H, Hemerly AS, Venâncio TM, Oliveira AEA, Grativol C. 2019. Cell wall dynamics and gene expression on soybean embryonic axes during germination. *Planta* 250: 1325-1337. DOI: 10.1007/s00425-019-03231-1
- Sano N, Permana H, Kumada R, Shinozaki Y, Tanabata T, Yamada T, Hirasawa T, Kanekatsu M. 2012. Proteomic Analysis of Embryonic Proteins Synthesized from Long-Lived mRNAs During Germination of Rice Seeds. *Plant Cell Physiology* 53(4): 687–698. DOI: 10.1093/pcp/pcs024
- Santos J. 2009. Proteínas. Estructuras Fascinantes. Buenos Aires. Ministerio de Educación de la Nación. p. 192.
- Schopfer P. 2006. Biomechanics of Plant Growth. *American Journal of Botany* 93(10): 1415–1425.
- Schopfer P, Plachy C. 1984. Control of Seed Germination by Abscisic Acid. *Plant Physiology* 76: 155-160. DOI: 10.1104/pp.64.5.822

Schussler JR, Brenner ML, Brun WA. 1984. Abscisic Acid and Its Relationship to Seed Filling in Soybeans. *Plant Physiology* 76: 301-306.

Sliwinska E, Bassel GW, Bewley JD. 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): 3587–3594. DOI: 10.1093/jxb/erp203

Steinbrecher T, Leubner-Metzger G. 2017. The biomechanics of seed germination. *Journal of Experimental Botany* 68(4): 765-783. DOI: 10.1093/jxb/erw428

Varela SA, Arana V. 2011. Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Silvicultura en Vivero* 3: 1-10.

Voigt J, Frank R. 2003. 14-3-3 Proteins Are Constituents of the Insoluble Glycoprotein Framework of the *Chlamydomonas* Cell Wall. *The Plant Cell* 15: 1399-1413. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.010611>

Wang W, Tai F, Chen S. 2008. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of Separation Science* 31: 2032-2039. DOI: 10.1002/jssc.200800087