

## T8 - DESHIDRATACIÓN, NIVELES ENDÓGENOS DE ABA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS INMADURAS DE SOJA.

CO Gosparini\* & EN Morandi

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR. Campo

Experimental J Villarino C.C. N° 14 (S 2125 ZAA) Zavalla - Santa Fe – Argentina Telefax:

+54 0341 4970080 int. 116 [cgospari@unr.edu.ar](mailto:cgospari@unr.edu.ar)

**Palabras Claves:** Soja - Semillas inmaduras - ABA - Germinación.

### INTRODUCCIÓN

El proceso de deshidratación es una parte integral del desarrollo de las semillas ortodoxas y se considera que el mismo juega un rol importante en el control del pasaje del programa de desarrollo al de germinación (Kermode *et al*, 1985). No obstante, existen casos de semillas que pasan por la etapa de deshidratación que caracteriza la fase final de la maduración pero no germinan, aún cuando se las coloque en condiciones favorables para hacerlo, pues poseen dormición. En muchos casos esta dormición se debe al contenido de inhibidores en uno o más tejidos de la semilla. De estos inhibidores el más conocido y estudiado es el ácido abscísico, ABA (Bewley *et al*, 1994).

Las semillas maduras de soja tienen niveles muy bajos de ABA y no presentan dormición. Muy diferente es la situación en las semillas inmaduras, en las que la concentración de ABA, [ABA], es elevada, evitando su germinación precoz durante el desarrollo, siendo la [ABA] del eje embrional, [ABA]<sub>e</sub>, la principal responsable de tal inhibición (Gosparini, 2002). El pico de [ABA] se registra hacia el final de la histodiferenciación (18 a 21 días después de la antesis, DDA) y disminuye progresivamente hasta valores muy bajos en madurez fisiológica, MF, (Schussler *et al*, 1984. Morandi *et al*, 1990).

Se ha informado que semillas inmaduras de soja pueden ser inducidas a germinar mediante tratamientos de deshidratado (Adams *et al*, 1981; Ackerson, 1984; Rosemberg *et al*, 1986). Ackerson, 1984, encontró que la deshidratación indujo la disminución de la [ABA] del embrión. Por el contrario, es un hecho conocido para tejidos vegetativos, que los niveles endógenos de ABA aumentan en respuesta a la deshidratación gradual (Seo *et al*, 2002; Setter *et al*, 1981), y en algunos casos este aumento también fue detectado en tejidos reproductivos (Ober *et al*, 1990, 1992; Benech Arnold *et al*, 1991). Se plantean así los interrogantes de si la deshidratación de semillas inmaduras de soja aumenta o disminuye los niveles de ABA endógeno y el posible rol de estas fluctuaciones en el control de la germinación prematura.

Los objetivos de este trabajo fueron: i) comprobar si la deshidratación induce fluctuaciones en la [ABA]<sub>e</sub> de las semillas inmaduras de soja, y ii) si la [ABA]<sub>e</sub> controla la velocidad de germinación de semillas inmaduras deshidratadas.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos inmaduros, provenientes de plantas de soja cv. Williams cultivadas en invernáculo, se cosecharon a los 30, 35, y 40 días después de antesis (DDA) y fueron deshidratados en estufa a  $27 \pm 1$  °C. Los valores de humedad relativa durante el tiempo que duró el tratamiento de deshidratación fluctuaron entre 55 y 60 %. Diariamente, durante 6 días, se extrajeron 30 semillas de sus respectivos frutos y se obtuvo su peso. El nivel de hidratación se expresó como la proporción de agua de la semilla, PAS, ( $\text{gH}_2\text{O.gps}^{-1}$ ). Una muestra de 10 semillas fue congelada en N<sub>2</sub> líquido, liofilizada y almacenada a -70 °C para el posterior análisis de ABA. Las 20 semillas restantes se pusieron a germinar en estufa a  $27 \pm 1$  °C y oscuridad. Una semilla se consideró germinada cuando su radícula atravesó el tegumento haciéndose visible. El porcentaje de germinación (%G) se determinó cada 24 h, hasta las 168 h. Al tiempo necesario para alcanzar el 50% G se lo denominó tG50. Las semillas liofilizadas fueron separadas en tegumento, cotiledones y eje embrional. La cuantificación de ABA se realizó sobre extractos acuosos crudos mediante radioinmunoanálisis en fase sólida, utilizando el anticuerpo monoclonal, DBPA1, de muy

alta afinidad para el isómero natural de la molécula de ABA libre, S-(+)-ABA (Vernieri *et al*, 1989). Cada determinación se realizó por duplicado.

## RESULTADOS

En la Figura 1 se puede apreciar que las semillas de 30, 35 y 40 DDA mostraron un incremento transitorio en la [ABA]<sub>e</sub> durante las primeras horas de deshidratación, con un pico a las 48 h. Cuanto menor fue la edad de las semillas mayores fueron la [ABA]<sub>e</sub> inicial y el pico alcanzado. Los niveles iniciales (0 h) y picos máximos (48 h) de [ABA]<sub>e</sub> fueron: 4,2 y 7,7; 2,3 y 5,8; y 1,8 y 2,6  $\mu\text{gABA.gps}^{-1}$ , para semillas de 30, 35 y 40 DDA; respectivamente. Las [ABA]<sub>e</sub> cayeron progresivamente luego de las 48 h hasta estabilizarse en valores muy bajos a partir de las 96 h de deshidratado en las semillas de 30 DDA (Fig. 1 A), y a partir de las 72 h en las semillas de 35 y 40 DDA (Fig. 1 B y C, respectivamente). Previo a su estabilización, las variaciones en los tG50 de las semillas de 30 a 40 DDA siguieron patrones similares a las variaciones en la [ABA]<sub>e</sub> (Fig. 1). Por lo tanto, el tG50 respondió a la [ABA]<sub>e</sub> hasta que la misma se redujo a niveles iguales o inferiores al umbral de inhibición o [ABA]<sub>e</sub> crítica, [ABA]<sub>c</sub>.

Por su parte la PAS descendió de manera continua durante el deshidratado (Fig. 1). Los niveles iniciales de PAS fueron de 2,07; 1,71 y 1,50  $\text{gH}_2\text{O.gps}^{-1}$  para semillas de 30, 35 y 40 DDA, respectivamente, disminuyendo en función del tiempo de deshidratación a una tasa promedio de 14,1; 9,8; y 8,1  $\text{mgH}_2\text{O.gps}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , para semillas de 30, 35 y 40 DDA, respectivamente. La tasa promedio de caída de la PAS *in planta*, entre los 30 y 40 DDA, fue de 1,9  $\text{mgH}_2\text{O.gps}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Luego, la tasa de caída de la PAS durante la deshidratación de las semillas inmaduras fue de 4 a 7 veces mayor que la observada naturalmente *in planta*.

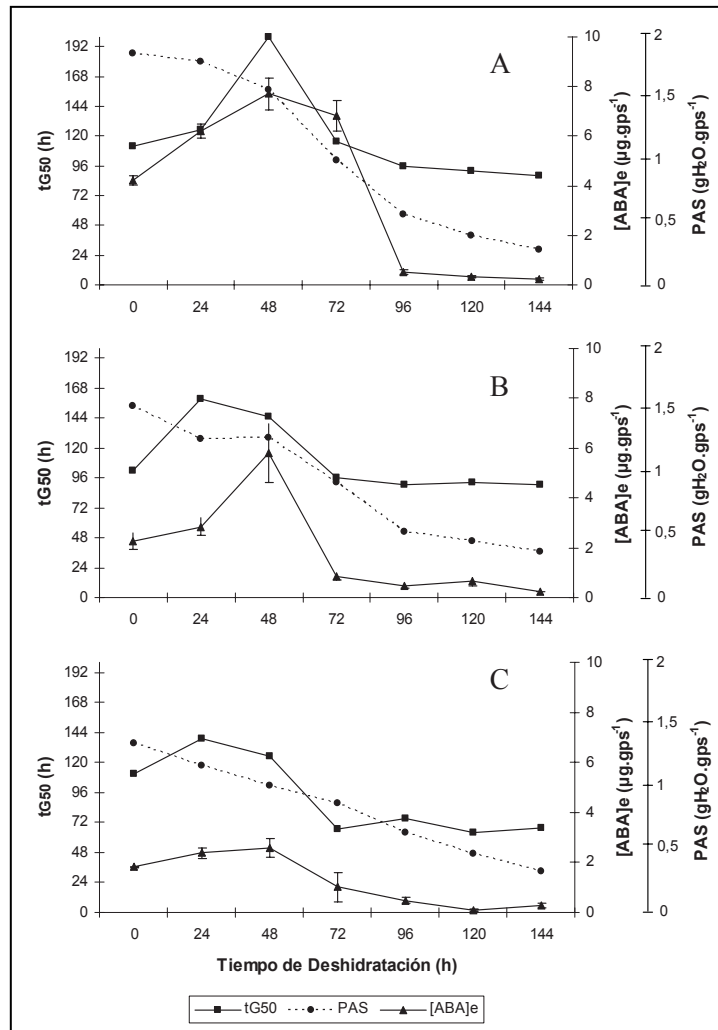
La evolución de la [ABA] en los cotiledones siguió el mismo patrón que para los ejes, aunque con mayores valores absolutos, mientras que en el caso de los tegumentos, el pico de [ABA] ocurrió a las 72 h en 30 DDA y a las 48 h en 35 y 40 DDA (datos no presentados). Se descartó que el aumento transitorio de [ABA]<sub>e</sub> observado durante el deshidratado fuera consecuencia de movimientos de ABA entre los distintos órganos de la semilla, dado que el incremento ocurrió en forma casi simultánea en todos ellos. Además, las tasas de deshidratado fueron 4 a 7 veces más rápidas que la natural *in planta*, lo que restringió el movimiento de agua y solutos. Es luego altamente probable que el incremento observado en la [ABA] se deba a síntesis *de novo*, ocurrida durante las primeras horas de la deshidratación. En este sentido se ha informado que embriones aislados de maíz poseen la capacidad de sintetizar ABA, y al igual que lo visto en soja, esa capacidad sólo se manifiesta cuando los mismos son sometidos a deshidratación gradual (Bochicchio *et al*, 1994). También se ha informado sobre la capacidad de síntesis de ABA en embriones inmaduros de girasol (Le Page-Degivry *et al*, 1992) y trigo (Garello *et al*, 1999) en medio de cultivo.

En la Fig. 2 se muestra la relación entre los valores calculados para el tG50 y la [ABA]<sub>e</sub> a partir de curvas ajustadas durante el período de aumento y descenso de la [ABA]<sub>e</sub>, para cada una de las tres edades (96 h para 30 DDA y 72 h para 35 y 40 DDA). Como se puede observar en la Fig. 2, todas las semillas ajustaron a una misma relación, independientemente de su edad y tiempo de deshidratado. La principal diferencia entre nuestros resultados y los de Ackerson (1984) es que este autor no detectó el pico en la [ABA] detectado en nuestras condiciones experimentales. Una posible explicación para esta discrepancia es que la tasa de deshidratado utilizada por Ackerson fue cinco veces mayor que la usada en nuestros experimentos. No obstante, es importante señalar que en ambas circunstancias la germinación se aceleró con la disminución en la [ABA] de los tejidos seminales hasta alcanzar la [ABA]<sub>c</sub>.

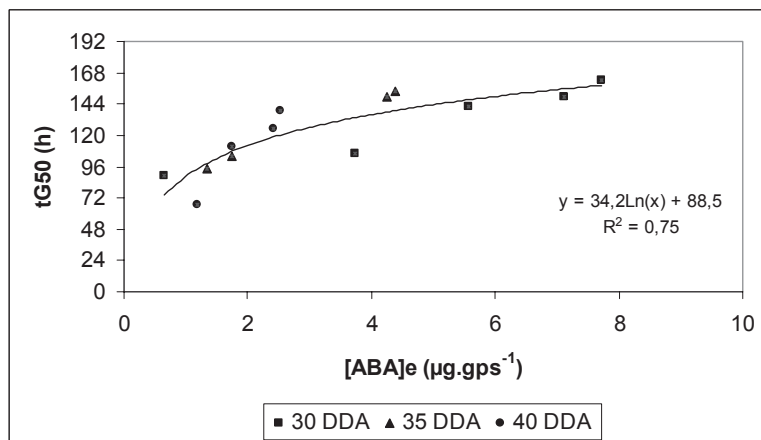
## CONCLUSIONES

- 1) En semillas inmaduras de soja de 30 a 40 DDA la tasa de deshidratación controla la evolución de la [ABA]<sub>e</sub>.
- 2) Por encima de la [ABA]<sub>c</sub>, la [ABA]<sub>e</sub> controla el tG50 de las semillas inmaduras.
- 3) La deshidratación *per se* no controla la tasa de germinación de las semillas inmaduras, siendo su efecto indirecto, a través de la inducción de cambios en la [ABA]<sub>e</sub>.

- 4) La estabilización del tG50 en valores prácticamente constantes luego de alcanzada la [ABA]c indica que, una vez removido el efecto inhibitorio del ABA, otro/s factores controlan la germinación de las semillas inmaduras.



**Figura 1.** Evolución de la [ABA]e, el tG50 y la PAS para semillas de soja de A) 30, B) 35 y C) 40 DDA, en función del tiempo de deshidratación. Las barras verticales corresponden al error estándar cuando su valor supera el tamaño del símbolo.



**Figura 2.** Relación entre el tG50 y la [ABA]e de semillas inmaduras de soja de 30, 35 y 40 DDA sometidas a distintos tiempos de deshidratado previo. Relaciones calculadas a partir de valores ajustados de tG50 y [ABA]e para el período de fluctuación de la [ABA]e (96, 72 y 72 h para semillas de 30, 35 y 40 DDA, respectivamente).

## BIBLIOGRAFÍA

- Ackerson, R.C. (1984a). Abscisic acid and precocious germination in soybeans. *J. Exp. Bot.* 35: 414-421.
- Adams, C.A. and Rinne, R.W. (1981). Seed maturation in soybeans (*Glycine max* L. Merr.) is independent of seed mass and of the parent plant, yet is necessary for production of viable seeds. *J. Exp. Bot.* 32: 615-620.
- Benech Arnold, R.L., Fenner M. and Edwards P.J. (1991). Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. induced by water stress during grain filling. *New Phytol.* 118: 339-347.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1994). Development, regulation and maturation. En: *Seeds Physiology of Development and Germination*. Second edition. Cap. 3, pp. 117-145. Plenum Press New York USA.
- Bochicchio, A.; Vernieri, P.; Puliga, S.; Balducci, F. and Vazzana, C. (1994). Acquisition of desiccation tolerance by isolated maize embryos exposed to different conditions: the questionable role of endogenous abscisic acid. *Physiol. Plant.* 91: 615-622.
- Garello, G. and Le Page-Degivry, M.T. (1999). Evidence for the role of Abscisic acid in the genetic and environmental control of dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Seed Sci. Res.* 9: 219-226.
- Gosparini, CO. (2002). Regulación del desarrollo embrional en soja: rol del ABA en el control de la germinación de semillas inmaduras de soja. Tesis Doctoral. Fac Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas UNR.
- Kermode, A.R. and Bewley, J.D. (1985). The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. I Acquisition of desiccation – tolerance and germinability during development of *Ricinus communis* L. seeds. *J. Exp. Bot.* 36: 1906-1915.
- Le Page-Degivry, M.T. and Garello, G. (1992). *In situ* Abscisic acid synthesis, *Plant Physiol.* 98: 1386-1390
- Morandi, E.N., Schussler J.R. and Brenner, M.L. (1990). Photoperiodically induced changes in seed growth rate of soybean as related to endogenous concentrations of ABA and sucrose in seed tissues. *Ann. of Botany.* 66: 605-611.
- Ober, E.S. and Setter, T.L. (1990). Timing of kernel development in water-stressed maize: Water potentials and Abscisic acid concentrations. *Ann. Bot.* 66: 665-672.
- Ober, E.S. and Setter, T.L. (1992). Water deficit induces Abscisic acid accumulation in endosperm of Maize viviparous mutants. *Plant Physiol.* 98: 353-356.
- Rosemberg L.A. and Rinne R.W. (1986). Moisture loss as a prerequisite for seedling growth in soybean seeds (*Glycine max* L. Merr.). *J. Exp. Bot.* 37: 1663-1674.
- Schussler, J.R., Brenner M.L. and Brun, W.A. (1984). Abscisic acid and its relationship to seed filling in soybeans. *Plant Physiol.* 76: 301-306.
- Seo, M., and Koshiba, T. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science.* 7: 41-48.
- Setter, T.L., Brun, W.A. and Brenner, M.L. (1981). Abscisic acid translocation and metabolism in soybeans following depodding and petiole girdling treatments. *Plant Physiol.* 67: 774-779.
- Vernieri, P., Perata, P., Armellini, D., Bugnoli, M., Presentini, R., Lorenzi, R., Ceccarelli, N., Alpi, A. and Tognoni, F. (1989a). Solid phase radioimmunoassay for the quantitation of Abscisic acid in plant crude extracts using a new monoclonal antibody. *J. Plant Physiol* 134: 441-446.