



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
Posgrado en Biotecnología

Tesis para optar al Título de Magíster en Biotecnología

Desarrollo de un sistema de vectores para la transformación y generación de plantas de soja intragénicas

AUTOR: Lic. BQ. Yaily Rivero Machado

TUTORA: Dra. Sabina Vidal

COTUTOR: Dr. Juan Pablo Gallino

Montevideo, Uruguay

2020

1 Índice

1	Índice.....	2
2	Índice de figuras	6
3	Índice de tablas	7
4	Listado de Abreviaturas.....	8
5	Resumen	11
6	Introducción.....	12
6.1	Producción de soja	12
6.2	Estrés abiótico y su impacto en la producción agrícola	14
6.2.1	Tolerancia a estrés hídrico	15
6.3	Mejoramiento genético de soja para aumentar la tolerancia a sequía.....	17
6.3.1	Estudios moleculares en soja para mejorar la tolerancia a sequía.....	18
6.3.2	La transgénesis como herramienta para aumentar la tolerancia a sequía	20
6.3.2.1	Sobreexpresión de factores de transcripción para incrementar la tolerancia al estrés hídrico.....	20
6.3.2.2	Sobreexpresión de proteínas o enzimas que participan en las vías de tolerancia al estrés hídrico	22
6.4	Nuevas estrategias de ingeniería genética para el desarrollo de cultivos con caracteres de interés	22
6.4.1	Intragénicos como una alternativa en el desarrollo de cultivos transgénicos	22
6.4.2	Edición genómica - sistema CRISPR/Cas9.....	25
6.4.3	Sistemas de eliminación de secuencias de ADN no deseadas	26
6.4.3.1	Sistema de 2 vectores.....	26
6.4.3.2	Co-transformación mediada por transposones.....	27
6.4.3.3	Recombinación sitio específica.....	27
6.4.4	Sistema Cre/loxP.....	28
6.5	Antecedentes del grupo de trabajo	30
7	Objetivos	31
7.1	Objetivo general.....	31
7.2	Objetivos específicos:	31
8	Estrategia experimental.....	32
9	Materiales y métodos	33
9.1	Material vegetal, condiciones de cultivo.....	33
9.1.1	Condiciones del cultivo.....	33

9.2	Desinfección de semillas para germinación <i>in vitro</i>	33
9.2.1	Semillas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	33
9.2.2	Semillas de Soja.....	34
9.3	Cepas de bacterias y condiciones de cultivo	34
9.3.1	Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas	34
9.4	Análisis de expresión génica mediante Northern Blot.....	35
9.4.1	Estudio de expresión génica del gen de soja GmDHN-27kDa	35
9.5	Aislamiento de regiones reguladoras de genes de soja.....	36
9.5.1	Promotor del gen ubiquitina (GmUbi)	36
9.5.2	Promotor del gen dehidrina (GmDHN)	36
9.5.3	3'UTR (terminador) del gen <i>VspB</i>	37
9.6	Genes reporteros	37
9.6.1	GUS-int.....	37
9.6.2	eGFP-GUS	38
9.7	Construcción del vector pSaby-pGmUbi	38
9.8	Construcción de vectores para biobalística	39
9.8.1	pSBio-pGmUbi y pSBio-pGmDhn.....	39
9.8.1.1	Clonado del casete de resistencia a higromicina en el vector pSBio.....	40
9.8.1.2	Clonado del módulo de regulación de la expresión de la cre recombinasa	41
9.8.1.3	Clonación de promotores	41
9.8.1.4	Clonado de genes reporteros para evaluar la actividad de las secuencias reguladoras	42
9.9	Construcción de vectores binarios	43
9.9.1	pSBin-pGmUbi	43
9.10	Transformación de cepas bacterianas.....	44
9.10.1	Transformación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> por choque térmico 44	
9.10.2	Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	44
9.10.3	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> por conjugación triparental	44
9.10.4	Análisis de los clones por secuenciación	45
9.10.5	Preparación del cultivo en glicerol.....	46
9.10.6	Purificación de ADN de electroforesis.....	46
9.10.7	Extracción de plásmidos por lisis alcalina	46
9.11	Transformación genética de plantas.....	47

9.11.1	Agroinfiltración de <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
9.11.2	Transformación transitoria por biolística	47
9.11.2.1	Construcciones génicas.....	47
9.11.2.2	Soluciones.....	48
9.11.2.3	Materiales.....	48
9.11.2.4	Recubrimiento de las partículas de tungsteno con ADN (microcarrier).....	48
9.11.2.5	Bombardeo de partículas.....	48
9.11.3	Transformación estable de soja por biolística.	49
9.11.3.1	Preparación de embriones.....	49
9.11.3.2	Bombardeo: preparación de Microcarriers.....	50
9.11.3.3	Bombardeo: recubrimiento de las partículas con ADN	50
9.11.3.4	Bombardeo de partículas.....	51
9.11.3.5	Medios de cultivo para inducción, mantenimiento y diferenciación de embriones somáticos de soja	51
9.12	Evaluación molecular de líneas transgénicas	52
9.12.1	Extracción de ADN genómico de plantas.....	52
9.12.2	Ensayo histoquímico de GUS	53
9.12.3	Microscopía para detección de GFP	53
9.12.4	Extracción de ARN total y mensajero.....	53
10	Resultados y discusión.....	54
10.1	Selección, aislamiento y caracterización de secuencias reguladoras de soja para dirigir la expresión constitutiva o inducible de genes (módulo 1)	54
10.1.1	Aislamiento del promotor constitutivo de soja y caracterización de su actividad	55
10.1.2	Aislamiento de un promotor inducible por estrés hídrico.....	60
10.2	Componentes y ensamblado de vectores para transformación génica	66
10.3	Sistema Cre/loxP para eliminar las secuencias no deseadas del genoma.....	68
10.3.1	Módulo de selección de células transformadas (módulo 4)	68
10.3.2	Delimitación de la secuencia a escindir post-transformación (módulo 2 y 3) ..	69
10.4	Construcción y evaluación de vectores pSBio-pGmUbi y pSBio-pGmDhn.....	70
10.4.1	Evaluación de vectores pSBio-pGmUbi y pSBio-pGmDhn	70
10.5	Generación de vectores para transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	74
10.6	Otras aplicaciones de estos vectores de transformación de soja	75

11	Conclusiones	77
12	Perspectivas	78
13	Anexos	79
13.1	Medio de cultivo: Murashige-Skoog (MS) (1 L).....	79
13.2	Mapa del vector comercial pCR-Blunt II- TOPO de Invitrogen de 3519 pb.....	80
13.3	Mapa del vector comercial de Invitrogen pCR2.1 de 3900 pb.	81
13.4	Representación esquemática de la serie de vectores pUbi – Dest.....	82
13.5	Mapa del vector pUB-DESTdesarmado.....	82
13.6	Listado de cebadores usados en las reacciones de PCR.....	83
13.7	Mapa del vector pER8	85
13.8	Mapa del vector pUHN4	86
13.9	Secuencia de ADN de los vectores para biolística	87
13.9.1	pSBio-pGmUbi	87
13.9.2	pSBio-pGmDHN.....	91
13.10	Vectores binarios	97
13.10.1	pSBin-pGmUbi	97
13.10.2	pSBin-pGmDHN.....	102
14	Referencias bibliográficas	109

2 Índice de figuras

Figura 1: Evolución de la soja en Uruguay en el período 2000-2018..... 13

Figura 2: Evolución fluctuante del rendimiento de soja en Uruguay (hg/ha) por año, en el período de 2000-2018..... 14

Figura 3: Esquema de mecanismos bioquímicos involucrados en la respuesta de estrés por sequía. 16

Figura 4: Ilustración de construcción de intragenes 24

Figura 5: Reacción de recombinación sitio específica mediada por el sistema Cre/loxP. 29

Figura 6: Representación esquemática de la estrategia utilizada en este proyecto..... 32

Figura 7: Representación esquemática de la secuencia sintética y la estrategia de clonado para la construcción del vector base pSBio. 40

Figura 8: Esquema representativo del método triparental..... 45

Figura 9: Soluciones stock para preparar los medios de cultivo de embriones somáticos y plantas de soja. 51

Figura 10: Medios de cultivo de embriones somáticos y plantas de soja..... 52

Figura 11: Árbol filogenético de la familia de genes de ubiquitina en soja..... 57

Figura 12: Gráfica comparativa de expresión, de los genes GmUbi 1 al 10. 58

Figura 13: Mapa del vector binario pSABY-pGmUBi..... 59

Figura 14: Expresión de β -glucuronidasa en hojas de *Nicotiana tabacum* transformadas de forma transitoria con *Agrobacterium tumefaciens*..... 60

Figura 15: Perfil de expresión del gen de dehidrina de 27 kDa por Northern blot en variedades de soja contrastantes..... 63

Figura 16: Representación esquemática de las vías de regulación transcripcional involucradas en las respuestas a estrés abiótico, dependiente e independientes del ABA ... 64

Figura 17: Análisis de elementos cis en la secuencia del promotor pGmDHN (1552pb) a través de la base de datos "PlantCARE" 65

Figura 18: Esquema de los vectores para la transformación genética de plantas por biolística..... 67

Figura 19: Representación esquemática de las secuencias resultantes luego de inducir el sistema Cre/loxP en plantas transformadas de forma estable con estos vectores. 69

Figura 20: Expresión transitoria en hojas de puerro y en hojas o embriones somáticos de soja transformados por biolística..... 72

Figura 21: Transformación estable de embriones de soja con los vectores para biolística.... 73

Figura 22: Embriones diferenciados de soja cultivar Jack transformados de forma estable con el vector pSBio-pGmUbi..... 74

Figura 23: Representación esquemática de la estrategia seguida para generar los vectores para transformación de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.. 75

3 Índice de tablas

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos	34
Tabla 2: Condiciones de PCR para amplificar el promotor de poliubiquitina de soja a partir de ADN genómico.....	36
Tabla 3: Condiciones de PCR para amplificar el promotor de Dehidrina de soja.....	37
Tabla 4: Condiciones de PCR para amplificar el terminador VspB de soja.....	37
Tabla 5: Condiciones de PCR para amplificar el gen reportero Gus-int.....	38
Tabla 6: Condiciones de reacción por PCR para amplificar la secuencia de eGFP-GUS a partir del vector pBGWFS 7.0	38
Tabla 7: Condiciones de reacción de PCR para amplificar las regiones que serán ensambladas usando GENEART.....	39
Tabla 8: Condiciones de PCR para amplificar el casete de regulación de la expresión de Cre que nombramos como XVE. Estos cebadores permiten el agregado de los sitios Afel y Spel en sus extremos 5'	41
Tabla 9: Condiciones de reacción de PCR para amplificar el promotor pGmUbi a partir del vector pSaby-pGmUbi.....	42
Tabla 10: Condiciones de reacción de PCR para amplificar pGmDhn a partir de ADN genómico de soja N7001	42
Tabla 11: Condiciones de reacción de PCR para amplificar el vector pUbidest- desarmado con un sitio Afel entre los bordes derecho e izquierdo.....	43
Tabla 12: Valores de expresión RPKM del gen GmUbi3 (Glyma20g27950) en diferentes tejidos según la base de datos “Soybean eFP Browser”.....	58
Tabla 13: Niveles de expresión basal de los genes DHN-13kDa y DHN-27kDa en diferentes tejidos y etapas de desarrollo tomados de la base de datos Soybean eFP Browser.	61
Tabla 14: Comparación de los niveles de expresión diferencial (fold change) de los genes DHN- 27 kDa (Glyma.09G185500) y DHN- 13 kDa (Glyma.19G114700) en condiciones de estrés por sequía con respecto a condiciones óptimas de riego, en tres estudios diferentes de transcriptómica de soja.	62
Tabla 15:Listado de cebadores usado en las reacciones de PCR.....	83

4 Listado de Abreviaturas

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Ácido abscísico
ABRE	ABA- responsive element
Ac/Ds	Sistema de transposición
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
AREB/ABF	Proteínas de unión a ABRE
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BET	Bromuro de etidio
bZIP	basic leucine zipper
CaMV35S	Del inglés “Cauliflower mosaic virus 35S” = Virus de Mosaico del Coliflor 35S
Cas9	Nuclease 9 del Sistema CRISPR
CAT	cloranfenicol acetiltransferasa
CBF	Factores de unión a repetidos C del inglés “C-repeats Binding Factors”
Col-0	Columbia-0 (ecotipo de <i>Arabidopsis thaliana</i>)
Cols.	colaboradores
Cre	Enzima Cre recombinasa
CRISPR	Del inglés: clustered regularly interspaced short palindromic repeats
cv.	cultivar
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DHN	Dehidrina
DO	Densidad óptica
DRE	Del inglés: Dehydration Responsive Element
DRE/CRT	del inglés: “dehydration responsive element/C-repeat
DREB	DRE Binding
DSI	Índice de susceptibilidad a la sequía del inglés “drought susceptibility index”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EST	Marcador de secuencia expresada
EtOH	etanol
EUA	Estados Unidos de América
<i>FLP/FRT</i>	sistema de recombinación
FNL	Medio de cultivo de plantas
G	Velocidad de centrifugación
GFP	Green Fluorescent Protein
GM	Genéticamente modificado
GUS	Gen de la β -glucuronidasa
HPT	Gen marcador de selección (homogentisate phytyltransferase)
InDels	Inserciones

INIA	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) en Uruguay
Kac	Acetato de potasio
LB	“Lysogeny Broth” – medio de cultivo para crecer bacterias
LB	Borde izquierdo del vector binario
LEA	Late Embryogenesis Abundant
/oxP	Sitios de reconocimiento de la enzima Cre
MAS	mejoramiento asistido por marcadores
MATVS	sistema de vector de transformación multi-auto –transformación
MCS	Del inglés “Multiple cloning site” = Sitio múltiple de clonado
MES	Del inglés Monohydrate 2- ethanesulfonic acid
Min.	Minuto
MOPS	Solución tampón
MS	Murashige-Skoog – medio de cultivo
MSD20	Medio de cultivo de mantenimiento de los embriones de plantas
MYB-R2R3	Familia de Factores de transcripción en Maíz
MYC/MYB	Familia de factores de transcripción de respuesta a estrés abiótico
NaAc	Acetato de sodio
NAC	Familia de factores de transcripción de respuesta a estrés abiótico
NEB	New England Biolabs
NTES	Solución tampón
ON	Del inglés “over night”= Toda la noche
p35S	Promotor 35S del virus de Mosaico del Coliflor
P5CR	pirrolina-5-carboxilato reductasa
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction
PEG	Polietilenglicol
ppt	Gen de fosfinotricina N-acetiltransferasa
psi	Libra por pulgada cuadrada
pUbi	Promotor de Ubiquitina
PVP40	Polivinilpirrolidona
QTLs	Locus de un carácter cuantitativo del inglés “quantitative trait loci”
R/RS	sistema de recombinación
RAPD	fragmentos polimórficos amplificados al azar
RB	Borde derecho del vector binario
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
Rif ^r	Resistencia a Rifampicina
RNAseq	Secuenciación de ARN
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPKM	Del inglés: Reads per kilobase of transcript, per Million mapped reads que significa lecturas por Kb de transcript, por millón de lecturas mapeadas.
rpm	Revoluciones por minutos
SDS	dodecilsulfato sódico
Seg.	Segundos
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
Sp.	Espectinomicina
SSC	Solución tampón
SSR	Microsatélites

SW	del inglés: "slow wilting"
T0	Generación de transgénicos
TA	Temperatura ambiente
TALEN	Del inglés: transcriptional activator-like effector nuclease
T-DNA	ADN de transferencia
TF	Factor de transcripción
TILLING	del inglés Targeting Induced Local Lesions in Genomes
Tm	Del inglés "Melting temperatura" = Temperatura de unión de los cebadores
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
v/v	Relación volumen/volumen
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt
YEP	"Yeast Extract Peptone" - Medio de cultivo
ZNF	Del inglés: zinc finger nuclease
α -32P	Para indicar que el grupo fosfato alfa de un nucleótido contiene fósforo 32

5 Resumen

La soja (*Glycine max*), una leguminosa nativa y domesticada en Asia, es uno de los principales cultivos a nivel mundial debido a los usos y beneficios que proporciona. Esta especie aporta nitrógeno (N) al suelo a través de la fijación biológica de nitrógeno como resultado de la simbiosis con bacterias como las pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, lo cual se refleja económicamente en la disminución de los costos de fertilización química. Entre otras aplicaciones, es usada para la acuicultura, en la producción de biocombustibles y como fuente de proteína en la dieta humana. El contenido de aceite vegetal contemplado entre un 18% y 22% y su alto contenido proteico evaluado entre un 40% y 42%, ambos evaluados en base seca, la posiciona a nivel mundial en un lugar de relevancia en términos de elección de una fuente alimenticia. Esto se ve reflejado en el aumento creciente de su producción a nivel mundial, incluyendo a Uruguay. Dicha producción tuvo un drástico crecimiento a partir de 2001, pasando de 30.000 hectáreas (ha) a superar el millón 300 mil ha en 2014 y 2015, el cual ha disminuido levemente en los siguientes años. De esta forma la soja se ha consolidado como el cultivo motor de la agricultura de secano del país. El aumento en el área de siembra no siempre ha estado acompañado de un incremento del rendimiento (kg/ha), lo que compromete la competitividad del cultivo. En la mayoría de las cosechas anuales entre 2001 y 2018 hemos presentado valores de rendimiento por hectárea por debajo de los principales países productores de soja como Estados Unidos, Brasil y Argentina. El bajo y fluctuante rendimiento se encuentra directamente asociado, entre otros factores, a la ocurrencia de períodos de déficit hídrico en los meses de diciembre y enero. En el ámbito del proyecto “Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de la soja” que se desarrolló en nuestro laboratorio, se realizó este trabajo de tesis, en el cual construimos un sistema de vectores genéticos para la transformación de soja con el objetivo final (del proyecto), de obtener variedades de soja mejoradas genéticamente para el carácter de tolerancia a sequía e intragénicas. Estos vectores permitirán la posterior eliminación de secuencias no deseadas de las plantas transformadas usando el sistema de recombinación sitio específica Cre/loxP, así como expresar inducible y constitutivamente genes de interés bajo la regulación de secuencias endógenas de este cultivo. Las construcciones génicas que desarrollamos también permitirán transformar la soja por el método físico de biolística y por el método biológico mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, pudiéndose realizar la transferencia de la información de un tipo de vector a otro (vector de biolística a vector binario). La evaluación de los casetes de expresión con secuencias reguladoras de soja se realizó con genes reporteros fusionados como GFP y gus. De esta forma, genes candidatos podrán ser introducidos en esta especie mediante ingeniería genética, resultando en la generación de intragénicos, cuyo costo de desregulación se espera que sea menor que para los transgénicos. Para expresar constitutivamente los genes candidatos en los vectores, usamos el promotor del gen de ubiquitina de soja. Por otro lado, se construyó otro vector que contiene un promotor inducible por déficit hídrico, identificado en el presente estudio. Estas secuencias se aislaron mediante el análisis de expresión de varios genes identificados previamente por ser inducibles frente a déficit hídrico en una variedad de soja tolerante a sequía. Se seleccionó el promotor de un gen que codifica una proteína de la familia de las dehidrasas para dirigir la expresión de genes de tolerancia a sequía. Este promotor, así como el promotor constitutivo del gen de ubiquitina de soja, fueron validados en ensayos de expresión transitoria y estable en soja. Este tipo de estrategias de mejoramiento posiciona al país como un generador de productos biotecnológicos de origen vegetal y no sólo como un aceptor pasivo de tecnologías desarrolladas en otros países.

6 Introducción

La soja (*Glycine max*) es una especie de la familia de las leguminosas (*Fabaceae*) cultivada por sus semillas y originaria de China. Contiene gran cantidad de nutrientes en base seca (en base al grano seco, sin humedad) que incluyen como promedio alrededor de un 20% de aceites, 35% de carbohidratos y un alto contenido de proteínas (40%). El grano de soja y sus subproductos (aceite y harina de soja, principalmente) se utilizan en la alimentación humana y del ganado, destacándose China como uno de los principales importadores. Dentro de sus características nutricionales se destaca el alto contenido de metabolitos secundarios [1], [2], oligosacáridos, isoflavonas, fitoestrógenos y goitrógenos.

Mientras que la soja ha sido tradicionalmente consumida en Japón, en una variedad de alimentos derivados de este cultivo, como el tofu, miso, shoyu y aceite vegetal, el consumo de esta especie ha aumentado en todo el mundo por los amplios beneficios reportados para la salud. Existen varios estudios que le atribuyen al consumo de soja, efectos tales como la disminución de colesterol, prevención de cáncer, obesidad y diabetes, y la protección contra enfermedades intestinales y renales [3].

Desde el punto de vista industrial, la soja se ha convertido en un buen candidato para la producción de biocombustibles [4]. Esta especie tiene la capacidad de fijar eficientemente el nitrógeno atmosférico [5] y por lo tanto requiere un aporte mínimo de fertilizante nitrogenado que a menudo representa el mayor costo económico en la agricultura.

6.1 Producción de soja

Más de 1,5 billones de hectáreas (alrededor del 12% de la superficie de tierra del mundo) son usadas para la producción agrícola [6]. La soja ocupa el 6% de las tierras cultivables y es la especie más representada dentro del grupo de las oleaginosas [7], abarcando el 57% de la producción total de semillas oleaginosas a nivel mundial [8].

Un estudio realizado por Davil Tilman y colaboradores en 2011 sugiere que el aumento de la demanda global de soja ocurrida en las últimas décadas se atribuye al incremento en el poder adquisitivo de la población de varias naciones, que a su vez repercute en los niveles de consumo de carne y por ende, en el consumo de suplementos alimenticios de origen vegetal para los animales de producción. En este estudio se pronosticó que entre 2005 y el 2050 la demanda global de calorías por cultivos en general podría aumentar alrededor de un 100% al igual que la demanda global de proteínas de origen vegetal. En este contexto, resulta evidente la necesidad de incrementar la producción agrícola para sostener la demanda creciente de alimentos.

Incrementar la producción y el rendimiento de soja en los países donde más se cultiva se ha convertido en un enorme desafío debido a que el aumento de las actividades agrícolas amplía la producción de gases de efecto invernadero y estos a su vez repercuten en las condiciones climáticas afectando los rendimientos en la producción de los cultivos y su calidad.

A partir del año 2000, la producción de soja en Uruguay aumentó considerablemente, pasando de ser un cultivo marginal a convertirse en el principal cultivo de exportación, superando al arroz y llegando a alcanzar un área de siembra y cosecha de 1,3 millones de hectáreas en los años 2014 y 2015 (Figura 1A).

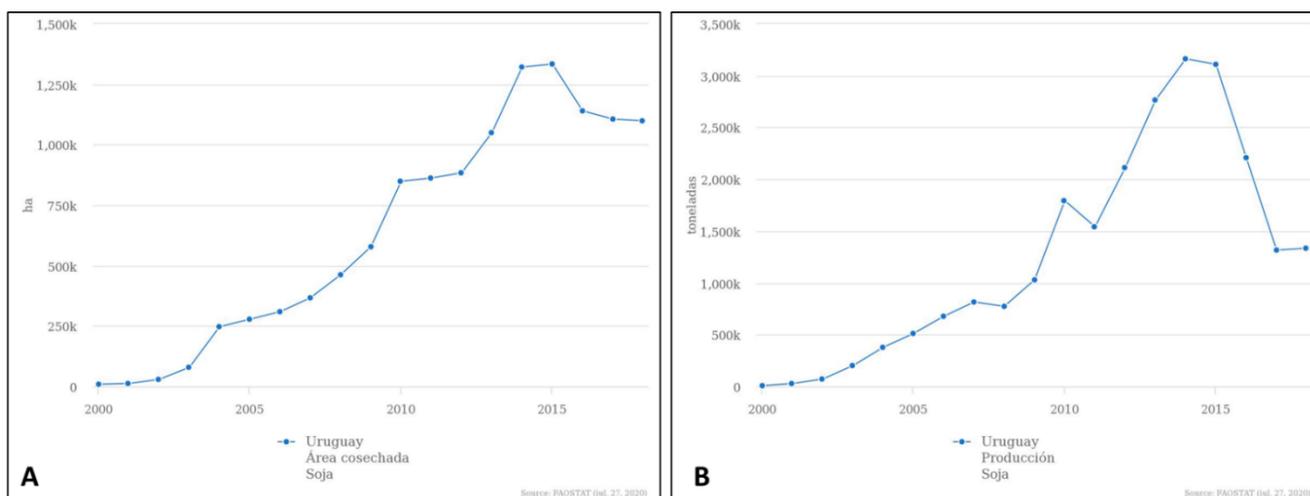


Figura 1: Evolución de la soja en Uruguay en el período 2000-2018. **A:** Gráfico que representa la relación entre el área de cosecha (ha) del cultivo con relación al tiempo (años). **B:** Gráfico de que relaciona la producción (toneladas de grano) con respecto al tiempo. Fuente: FAOSTAT (27/07/2020).

Esta intensificación en el cultivo de soja ha ubicado fluctuante al país entre los 10 principales productores de soja a nivel mundial, llegando a superar los tres millones de toneladas en los años 2014 y 2015 (“FAOSTAT,” 27/07/2020)(Figura 1 B).

El drástico incremento en el área del cultivo no ha sido acompañado por un crecimiento de la productividad del mismo. El rendimiento de la soja en Uruguay se sitúa alrededor de los 2200 kg/ha, siendo este significativamente inferior al promedio de países como Argentina, Brasil y EUA (cerca de los 3000 kg/ha). A su vez, el rendimiento en Uruguay presenta una alta variación interanual, asociada en gran medida a la ocurrencia de períodos de déficit hídrico que ocurren frecuentemente durante todo el ciclo de vida del cultivo (Figura 2).

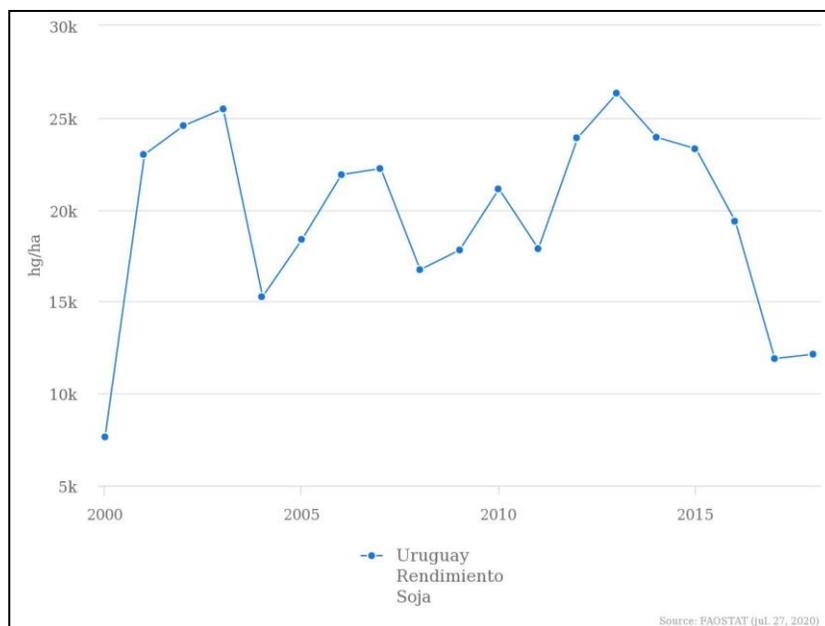


Figura 2: Evolución fluctuante del rendimiento de soja en Uruguay (hg/ha) por año, en el período de 2000-2018. En el gráfico se puede observar una importante caída en el rendimiento desde el 2013, año en el que se alcanzó el máximo. 30K hg/ha = 30 000 hg/ha = 3000 kg/ha. Fuente: FAOSTAT (27/07/2020).

Este rendimiento bajo y variable representa una amenaza para la competitividad de la soja en un escenario de fluctuaciones en los costos de producción y en los precios del grano.

El aumento creciente en la producción de soja en Uruguay a partir del año 2000 estuvo impulsado en gran medida por la liberación, en 1996, del primer evento transgénico de soja (MON 40-3-2) en el país. Actualmente casi el 100% de la soja que se produce se encuentra modificada por ingeniería genética, para caracteres de resistencia a insectos y a herbicidas. Estas características agregadas, principalmente la resistencia a herbicida ha revolucionado el modo de producción de este cultivo, haciéndolo más rentable y productivo.

6.2 Estrés abiótico y su impacto en la producción agrícola

Tanto los factores de estrés biótico como abiótico pueden afectar el desarrollo y la productividad de las plantas. Entre los factores ambientales que más inciden en el desarrollo y rendimiento de los cultivos está la sequía[10].

El estrés por déficit hídrico ocurre cuando la tasa de transpiración excede la toma de agua, esto interfiere en la fisiología de la planta conllevando fundamentalmente a la reducción del potencial hídrico y de la turgencia de la misma. En términos de producción de los cultivos, el déficit hídrico afecta el rendimiento a través de la disminución en la acumulación de materia seca y tiene efectos negativos sobre el crecimiento celular, la expansión foliar y la fijación biológica de nitrógeno, que es especialmente vulnerable a las deficiencias de agua [11].

La susceptibilidad de las plantas al estrés hídrico varía dependiendo del grado de estrés, de su combinación con otros factores de estrés, del genotipo de la planta y de su etapa de desarrollo [12].

En general, las plantas responden al déficit hídrico a través de cambios de índole morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Dentro de las respuestas morfológicas se encuentran la reducción del crecimiento celular por la disminución de la presión de turgencia; la reducción del número de hojas por planta, el tamaño de la hoja y su longevidad. Estas respuestas ocurren como consecuencia de la reducción de la fotosíntesis en condiciones de estrés [13], [14]. También disminuye la biomasa húmeda y seca de la planta [15].

Dentro de los cambios fisiológicos se encuentra la señalización de hormonas como el ácido abscísico (ABA), quien juega un rol esencial en la respuesta al estrés abiótico, las citoquininas y el etileno. Los factores de estrés ambientales como la sequía, la salinidad, el frío, el calor y las heridas disparan niveles elevados de ABA. Esta hormona naturalmente tiene un rol regulador en la activación de genes de respuesta al estrés, en la apertura y cierre estomático, la maduración del fruto, en el crecimiento radicular, la germinación, la dormancia de brotes y semillas, en el desarrollo de las semillas y en la maduración de embriones [16]–[19].

Dentro de las respuestas bioquímicas la producción de Especies reactivas del oxígeno (ROS) actúan como un mensajero secundario a subsecuentes reacciones de defensa en plantas. ROS, que incluye iones oxígeno, radicales libres y peróxidos forman parte del metabolismo normal de oxígeno y juegan un rol importante en la señalización celular. Sin embargo, durante el estrés ambiental como la sequía, los niveles de ROS pueden aumentar dramáticamente resultando en el daño oxidativo de proteínas, ADN y lípidos a través de la peroxidación lipídica, degradación de proteínas y fragmentación del ADN hasta la muerte celular en las plantas. De esta forma el estrés hídrico produce estrés oxidativo.

El balance entre la producción de ROS y las enzimas antioxidantes determina si se producirá señalización oxidativa o daño [20]. La capacidad de estas enzimas para transformar las ROS y disminuir los efectos de daño puede correlacionarse con la resistencia de las plantas a la sequía.

6.2.1 Tolerancia a estrés hídrico

La tolerancia a la deshidratación en las plantas está dada por la activación de un conjunto de mecanismos de defensa que permiten responder al estrés. Una gran cantidad de genes son activados y como consecuencia, numerosas proteínas son producidas para contribuir a las rutas metabólicas que dirigen sinérgicamente al incremento de la tolerancia al estrés (Figura 3) [21].

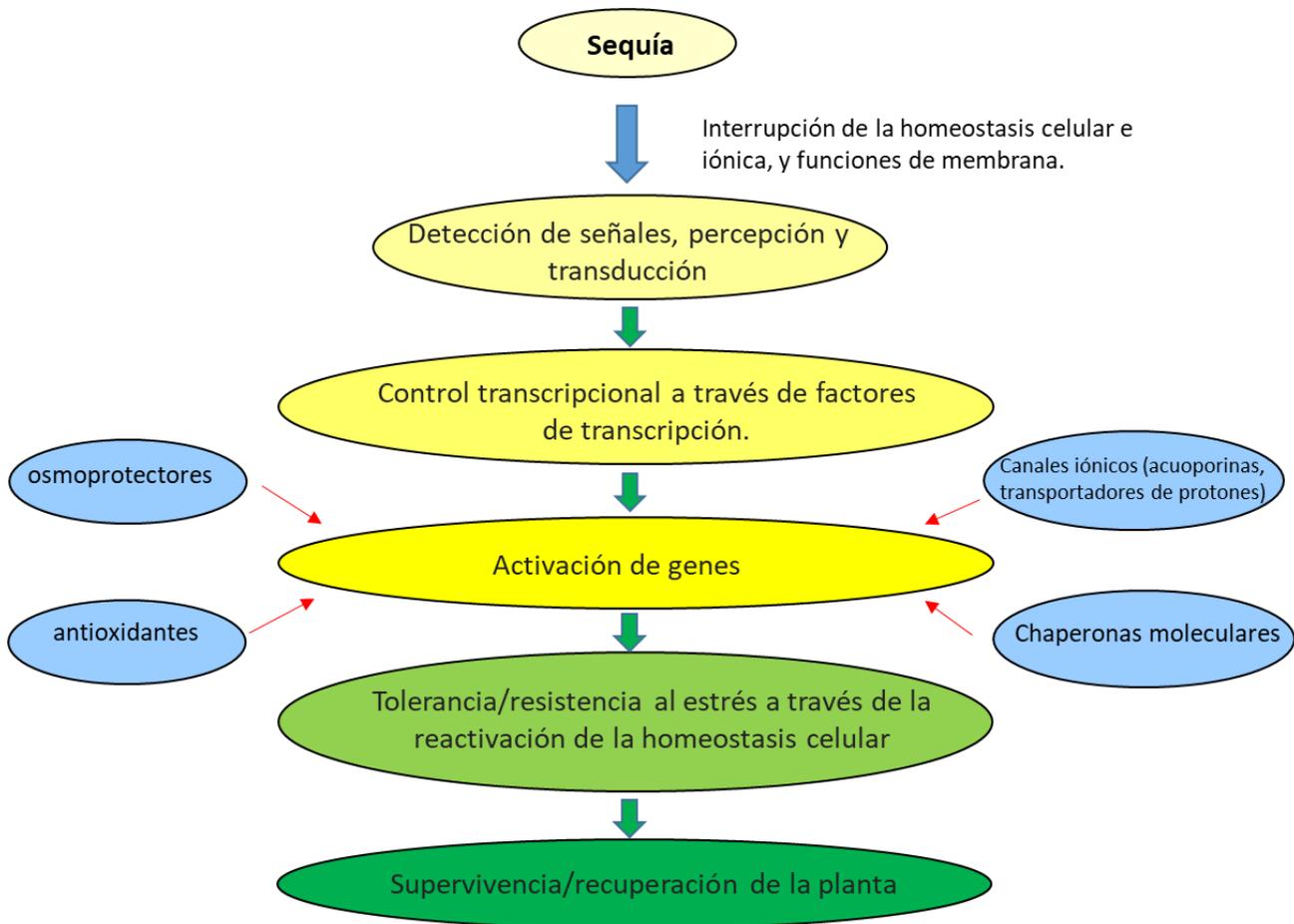


Figura 3: Esquema de mecanismos bioquímicos involucrados en la respuesta de estrés por sequía. Tomado y traducido de *Plant and Cell Physiology*, Volume 50, Issue 7, July 2009, Pages 1260–1276, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp082>

Como característica general, la respuesta de las plantas frente al estrés puede ser regulada de forma dependiente de ABA o independiente. Muchos factores de transcripción, como los CBF/DREB, que se unen a elementos sensibles a deshidratación/repetidos-C (DRE/CRT, del inglés: “dehydration responsive element/C-repeat”) y las proteínas de unión al elemento de respuesta a ABA (ABRE), participan en la respuesta al estrés hídrico mediante la unión a elementos regulatorios *cis* contenidos dentro de las regiones promotoras de sus respectivos regulones [22].

Las dehidrinas (DHNs) son una de las familias de proteínas que se inducen por estrés y juegan un rol en la respuesta adaptativa al estrés hídrico como mecanismo de tolerancia en las plantas. Estas proteínas pertenecen al grupo 2 de proteínas LEA (iniciales de “Late Embryogenesis Abundant” en inglés, que significa: “abundantes en la embriogénesis tardía”).

Las dehidrinas se acumulan en todos los tejidos en condiciones de estrés abiótico [23], [24] y en las semillas en forma constitutiva [25], [26]. En particular, los genes que codifican dehidrinas son generalmente inducidos en tejidos vegetativos por ABA y en respuesta a condiciones de estrés abiótico como salinidad, deshidratación, frío y congelamiento [27], exhibiendo una gama de funciones, entre las que se encuentran las de tipo chaperona,

protegiendo macromoléculas y estructuras celulares a través de su unión al ADN, fosfolípidos de membranas y a otras proteínas. A su vez, también se les ha atribuido a algunos miembros de esta familia, la capacidad de unirse a metales pesados y de actuar como secuestradores de ROS, protegiendo a las células del estrés oxidativo [28].

La unión de las DHNs a la superficie parcialmente deshidratada de otras proteínas promueve la formación de hélices α anfipáticas en una molécula de DHN y protege a otras proteínas de una mayor pérdida de la capa de agua (que puede conducir a cambios irreversibles en su conformación, es decir, desnaturalización de proteínas). Se ha sugerido que estas interacciones entre las superficies parcialmente deshidratadas de las moléculas de DHN y otras proteínas y/o biomembranas (observadas por Koag y colaboradores en el 2003 en el caso de DHN1 de maíz), constituyen la base de las funciones protectoras de las dehidrininas [29].

6.3 Mejoramiento genético de soja para aumentar la tolerancia a sequía.

La historia del mejoramiento genético de soja para la tolerancia al estrés hídrico es relativamente reciente. Hasta 1980 no había genotipos de soja identificados con tolerancia agronómica a la sequía. La primera fuente identificada de tolerancia a estrés hídrico se produjo con la descripción de líneas de marchitamiento lento (SW, del inglés: "slow wilting") [30], [31].

El marchitamiento lento se define como una respuesta de marchitamiento tardío a la disminución de la humedad del suelo en comparación con un cultivar de soja promedio. La evidencia mostró que la respuesta de marchitamiento (marchitamiento rápido o lento / retardado) de los genotipos de soja al estrés por sequía difiere (Sloane, Patterson, & Carter, 1990), y los genotipos de marchitamiento lento tienen la capacidad de conservar la humedad del suelo [32]–[34] al reducir la tasa de transpiración para mantener la presión de turgencia en comparación con los genotipos de marchitamiento rápido convencionales [35].

El marchitamiento es el primer síntoma de estrés visible de la deficiencia de agua del suelo causada por sequía y el fenotipo SW en soja se puede identificar con respecto a otros cultivares de soja promedios. El primer fenotipo SW en soja fue identificado en la línea Japonesa PI 416937, que se caracterizó visualmente por ser más vigorosa en el campo y también por un mayor contenido relativo de agua en comparación con el marchitamiento rápido de otros cultivares [31], [36]. Estas características, junto con el mantenimiento superior de la turgencia celular y una capacidad de producción competitiva en condiciones de sequía, hicieron del PI 416937 un recurso genético útil para el desarrollo de nuevas variedades de soja tolerantes a la sequía.

Si bien quedan muchas preguntas por responder sobre el mecanismo por el cual se puede identificar este fenotipo SW en las variedades de soja tolerantes a sequía, se ha convertido en un rasgo particularmente útil en los programas de mejoramiento en los países menos

desarrollados, que buscan sistemas de marcadores asequibles y visibles para mejorar la tolerancia a la sequía [37].

El mejoramiento empírico tiene como desventaja que depende exclusivamente de la presencia de genes útiles en la población sexualmente compatible. A su vez, la introgresión de genes a un genotipo mediante cruzamiento resulta en la transferencia de otras regiones genómicas que pueden ser no deseadas. Además, para lograr una ganancia deseada a través de la mejora tradicional, puede ser necesario llevar a cabo un número elevado de ciclos de selección y de reproducción. Sin embargo, la mejora en un rasgo, a través de la reproducción convencional no es posible si la variación genética apropiada en el conjunto de genes de un cultivo es muy baja o ausente. Esto ocurre con las variedades de soja que se comercializan, que presentan una base genética generalmente muy estrecha, lo cual explica las pocas referencias al carácter de tolerancia a sequía comparado con otros cultivos sembrados en las mismas regiones geográficas.

El éxito limitado en mejorar la tolerancia a la sequía en los cultivos podría deberse también a que el rasgo de tolerancia a la sequía es controlado por múltiples genes que tienen efecto aditivo, es decir, es un factor multigénico y cuantitativo. Además, existe una fuerte interacción entre los genes para la tolerancia a la sequía y los involucrados en el rendimiento potencial. Por otro lado, el tiempo, la intensidad, la duración y frecuencia del déficit hídrico, así como las interacciones planta-suelo-atmósfera son factores que influyen en la respuesta de las plantas [38].

Por las razones antes expuestas, es necesario buscar enfoques más eficientes para complementar los enfoques convencionales y poder alcanzar mayores grados de tolerancia a la sequía.

La disponibilidad de toda la secuencia del genoma, los mapas físicos, la genética y las herramientas genómicas funcionales, los enfoques integrados que utilizan la mejora genética y la ingeniería genética, ofrece nuevas oportunidades para mejorar la resistencia a la sequía en la soja [21].

6.3.1 Estudios moleculares en soja para mejorar la tolerancia a sequía

Dentro de los marcadores moleculares asociados al mejoramiento genético de soja para la tolerancia a sequía se ha identificado cierto número de QTLs (del inglés: “quantitative trait loci”, que significa: locus para un carácter cuantitativo) [39], [40]. Los QTLs son regiones del genoma, no necesariamente asociados con un gen sino que pueden abarcar varios genes en un fragmento de ADN. La variación alélica del QTL puede causar variación fenotípica en un rasgo cuantitativo.

Se han identificado QTLs asociados con el rendimiento [41], [42] y con el marchitamiento de las hojas [35], [42] en pocas cantidades, de 1 a 3 QTLs.

Du y colaboradores (2009) identificaron 19 QTLs asociados con el rendimiento de semillas por planta bajo estrés hídrico con respecto a semillas por planta con buena hidratación. Además, identificaron 10 QTLs asociados con el índice de susceptibilidad a sequía (DSI) en soja. Este índice evalúa el rendimiento de un genotipo bajo condiciones de sequía en relación al rendimiento sin sequía, como una estimación de la adaptabilidad del genotipo sobre un rango de ambientes. En resumen, la fórmula responde a la pérdida relativa de rendimiento de cada genotipo dividida por la pérdida media de todos los genotipos testeados en el experimento. De esta forma es un parámetro que permite seleccionar genotipos resistentes a sequía lo cual sumado a la selección por marcadores moleculares como los QTLs respalda el mejoramiento genético en cuanto a este carácter [43].

Ye y colaboradores (2019) demostraron que dos QTLs ubicados en los cromosomas 6 y 10 contribuyen entre un 20% y 30% con la asociación entre el SW y el rendimiento del cultivo en condiciones de sequía y se confirmaron por primera vez los efectos del SW QTL como herramienta en el mejoramiento asistido por marcadores (MAS) y con grandes posibilidades de aplicarlo para mejorar la tolerancia a sequía en otros grupos de madurez de la soja [44].

Estas regiones genómicas explican menos del 10% de la variación fenotípica observada entre los distintos genotipos [21]. Esto significa que ninguno de los parámetros utilizados para analizar los diferentes mecanismos de resistencia a sequía es suficiente, por sí mismo, para evaluar fenotípicamente el grado de resistencia a este estrés en esta especie. En este contexto, resulta indispensable el empleo de estrategias que integren distintas aproximaciones experimentales para generar cultivares elites con un alto potencial de rendimiento bajo condiciones de estrés como la sequía.

La identificación de genes asociados a la tolerancia al estrés es clave para el mejoramiento genético convencional y molecular de una especie en cuestión; ya sea para el desarrollo de marcadores moleculares que asistan la evaluación del grado de tolerancia de un genotipo en particular, como para el mejoramiento de un cultivo por transgénesis [45]. El desarrollo de herramientas moleculares derivadas de la genómica y post genómica, incluyendo los análisis transcripcionales y metabólicos, constituyen herramientas valiosas para la identificación de genes candidatos. En soja existe gran cantidad de información a nivel genómico en el ámbito internacional. Se cuenta con un mapa consenso con más de mil marcadores SSR mapeados en 20 grupos de ligamiento saturado con marcadores RFLP, RAPD y AFLP, al que se han incorporado secuencias de DNAC [46]. El genoma está secuenciado y disponible en la base de datos Phytozome y se cuenta actualmente con más de 400 000 ESTs en bases de datos de GenBank [47] y alrededor de 4700 SNPs y 839 InDels [48]. Existe una base de datos de SNPs en soja con información de secuencias de cebadores, posición de SNP así como secuencias de alelos presentes en seis genotipos y el mapa integrado completo con SSR, RFLP y SNPs (<http://bfgl.anri.barc.usda.gov/cgibin/soybean/Linkage.pl>). Asimismo, se han desarrollado microarreglos de ADN comerciales (Affymetrix® GeneChip) y recientemente se ha reportado el desarrollo de TILLING en soja [49]. Sin embargo, la mayoría de los genes candidatos identificados por las herramientas antes descritas no han sido aún validados experimentalmente.

6.3.2 La transgénesis como herramienta para aumentar la tolerancia a sequía

Algunas estrategias biotecnológicas que han permitido el desarrollo de plantas con aumento en la resistencia a condiciones de estrés son basadas en la ingeniería genética. La transgénesis es una herramienta de mejoramiento genético muy poderosa que permite incorporar genes nuevos, así como modular la expresión de genes endógenos involucrados en caracteres de interés. Existen varios ejemplos de ingeniería genética que han logrado incrementar la tolerancia al déficit hídrico en soja. Algunos de ellos se enfocaron en la manipulación de genes de factores de transcripción, mientras que otros trabajos han optado por incrementar la expresión de genes de respuesta, como enzimas y otras proteínas involucradas en la tolerancia al estrés.

6.3.2.1 Sobreexpresión de factores de transcripción para incrementar la tolerancia al estrés hídrico

Los factores de transcripción son proteínas que reconocen y se unen a secuencias cortas de ADN específicas de las regiones reguladoras de genes (por ejemplo; promotores, intrones y potenciadores) y han resultado ser buenos candidatos para el mejoramiento de la tolerancia al déficit hídrico.

Un ejemplo muy representativo, identificado y desarrollado en Argentina, corresponde al factor de transcripción (TF) de girasol, *HaHB4* (*Helianthus annuus* HomeoBox 4). Este TF, perteneciente a la familia de homeodominio- Zipper de leucina I, ha sido introducido en varias especies vegetales, *Arabidopsis*, cereales (trigo) y soja. Su evaluación en una amplia gama de condiciones de cultivo exhibió una mejor adaptación a entornos propensos a la sequía [50].

Una investigación más profunda sobre el mecanismo desencadenado por este gen *HaHB4* para conferir tolerancia a la sequía indicó que no implicaba el cierre de los estomas. Esto es una ventaja, ya que el cierre de los estomas, si bien conduce a la tolerancia a la sequía, generalmente se acompaña de una penalización en el rendimiento en algunos entornos. En particular, los autores de este estudio asocian la función de este TF a un retraso de la senescencia a través de la inhibición de los receptores de etileno [51]. Sin embargo, el descubrimiento más importante fue que las plantas de *Arabidopsis* continuaban creciendo cuando el estrés era moderado y, por lo tanto, el impacto negativo en la productividad se redujo con respecto a las plantas de control que exhibieron cierre de estomas. Cuando las plantas fueron sometidas a estrés severo (no regadas durante 10-20 días), las tasas de supervivencia fueron mucho más altas para las plantas genéticamente modificadas (GM) que expresan *HaHB4* que para los controles de tipo silvestre [52]. A nivel de campo y en una gama amplia de condiciones los transgénicos de *HaHB4* superaron a los controles silvestres tanto

en el *HaHB4* expresado en *Arabidopsis*, como el expresado en soja y trigo [53], [54]. En estos estudios, se expresó la región codificante de *HaHB4* bajo la regulación del promotor de ubiquitina, en el caso de trigo y *Arabidopsis*, o del promotor propio del gen *HaHB4*.

Por otro lado, otros factores de transcripción que han sido reportados por su aporte a la tolerancia a sequía, como los DREBs (del inglés: Dehydration responsive element binding), pertenecientes a la familia de factores de transcripción de respuesta a etileno (ERF del inglés: “ethylene response factors”), que desempeñan un rol fundamental en la tolerancia a múltiples tipos de estrés [55].

Ejemplo de estos estudios, es el caso de la sobreexpresión de *AtDREB1A* de *Arabidopsis*, bajo el control del promotor inducible por estrés rd29A, el cual mejoró con éxito la respuesta de tolerancia a sequía en *Arabidopsis thaliana* [56]–[58], tabaco [59], arroz [60]–[62], trigo [63], [64] y maní [65]–[67].

Un cultivar de soja BR16 sensible a sequía fue transformado también con el gen *AtDREB1A* bajo el control de este promotor inducible de *A. thaliana* (rd29A). Las plantas modificadas sintetizaron más clorofila, presentaron elevada conductancia estomática y mayores tasas fotosintéticas, así como menores tasas de transpiración. Varios genes relacionados con la respuesta a sequía fueron altamente expresados cuando se sometieron a un tratamiento de déficit de agua severo. Estos resultados indicaron que la sobreexpresión de *AtDREB1A* en soja puede mejorar la tolerancia a sequía [68].

Otro miembro de la familia DREB, la proteína DREB2A, ha sido usado para desarrollar plantas genéticamente modificadas tolerantes a sequía. Ha sido sobreexpresada en *A. thaliana* constitutivamente con resultados significativos de tolerancia a estrés por sequía y calor [69], [70]. Genes homólogos de *AtDREB2A* fueron estudiados en maíz [70], arroz [60], girasol [71], trigo [72] y crisantemo [73]. *AtDREB2A* también fue introducido exitosamente en soja. El análisis molecular conducido bajo experimentos hidropónicos muestra que las plantas transgénicas exhibieron una elevada expresión del transgén en las raíces, en períodos de déficit hídrico. Mizoi y colaboradores, en el 2013, identificaron un gen de soja DREB2, GmDREB2A, y mostraron que la expresión heteróloga en *Arabidopsis* estimula genes inducibles por estrés como RD29A, RD29B, HsfA3 y HSP70 y mejora la tolerancia a estrés [74]. Estos hallazgos demuestran que las plantas que sobreexpresan las proteínas *AtDREB2A* y DREB2A adquieren mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico como sequía y calor [75]. GmDREB2 también fue sobreexpresado en soja, confiriéndola a este cultivo tolerancia a sequía y a elevada salinidad en las plantas transgénicas [76].

Otra experiencia con el gen de soja *GmDREB3* y su sobreexpresión demostró que mejora la tolerancia a sequía en paralelo con la acumulación de prolina [77].

La familia de proteínas AREB del inglés “ABA – responsive element- binding” traducido como “unión a elemento de respuesta a ABA” han mostrado resultados interesantes confiriendo

también tolerancia a sequía. En *Arabidopsis*, AREB actúa como el principal factor de transcripción bajo estrés abiótico [78], [79] y se ha reportado que regula las respuestas al estrés ambiental y la señalización de ABA durante la etapa vegetativa [80]–[83].

En soja, el gen AREB1 de *A. thaliana* fue introducido y sobreexpresado, obteniéndose líneas AtAREB1FL que mostraron la habilidad de sobrevivir por un período de 5 días sin agua bajo condiciones de invernáculo, sin mostrar daño en las hojas. Estas líneas también mostraron un mejor crecimiento y rendimiento fisiológico bajo déficit hídrico (mayor tasa relativa de longitud del brote, conductancia estomática y fotosíntesis) en comparación con las silvestres [84].

Otro ejemplo, lo constituye el gen AtMYB44, un factor de transcripción MYB tipo R2R3 de *Arabidopsis* que participa en la señalización de estrés abiótico mediada por ABA[85]. La expresión ectópica de AtMYB44 en soja condujo a una mejor tolerancia a sequía pero con una reducción de su crecimiento fenotípico en condiciones normales [86].

6.3.2.2 Sobreexpresión de proteínas o enzimas que participan en las vías de tolerancia al estrés hídrico

Además de la sobreexpresión de factores de transcripción, se ha incrementado la expresión de enzimas u otras proteínas que participan en vías específicas, o en la tolerancia a estrés hídrico.

Uno de los genes reportados en este sentido fue la introducción del gen NTR1 de *Brassica campestris* que codifica para la carboxil mentiltransferasa de ácido jasmónico. Este gen en soja aumentó la acumulación de metil jasmonato y con ello aumentó la tolerancia a la deshidratación durante la germinación de las semillas [87].

También se ha trabajado mucho con la enzima pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR), que cataliza el primer paso de la biosíntesis de L-prolina a partir de 1-pirrolina-5-carboxilato. La prolina participa en la osmoregulación de la célula vegetal en condiciones de estrés por sequía con un bajo contenido relativo de agua. De Ronde y colaboradores en el 2004, demostraron que la sobreexpresión del gen P5CR de *Arabidopsis*, en soja, bajo la regulación del promotor inducible por estrés, incrementaba los niveles libres de prolina y resultaba en un mayor contenido relativo de agua en las plantas transgénicas [88].

6.4 Nuevas estrategias de ingeniería genética para el desarrollo de cultivos con caracteres de interés

6.4.1 Intragénicos como una alternativa en el desarrollo de cultivos transgénicos

A la fecha, todos los ejemplos de soja tolerantes a sequía modificados genéticamente tienen en común que incorporan secuencias heterólogas en su genoma, ya sea los genes para

conferir la característica de tolerancia, secuencias reguladoras o genes marcadores para la selección de los transformantes.

Para la obtención de una planta transgénica, es necesaria la incorporación de una región de ADN en su genoma, para que luego ésta sea heredada de manera estable en las sucesivas generaciones. Se pueden incorporar genes de otros organismos, genes de otras plantas o genes de la misma planta, pero con modificaciones. Comúnmente se usan secuencias reguladoras de otras especies (promotores y terminadores) para modular la expresión génica. Además, en los procesos de transformación genética de plantas, generalmente se utilizan secuencias adicionales que permiten la selección de las células transformadas, como por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos o herbicidas.

El área agrícola usada para el cultivo de transgénicos ha aumentado sin precedentes a partir de su introducción hace 20 años, superando los 160 millones de hectáreas en el total de países que se producen. La primera generación de transgénicos comprendió cultivos primarios como la soja, maíz, algodón y canola con tolerancia a herbicidas y larvas de insectos. La segunda generación de cultivos transgénicos comprendió rasgos para mejorar los beneficios para la salud, la tolerancia a sequía, así como el uso eficiente de nitrógeno [89]. Si bien la transgénesis es una herramienta muy exitosa, sólo una fracción de los potenciales cultivos genéticamente modificados es comercializada. Esto se debe en parte a los elevados costos y extensos procedimientos para obtener la aprobación de los cultivos GM. Diferentes estudios muestran claramente que una de las principales preocupaciones de la sociedad sobre los cultivos transgénicos es la combinación artificial de elementos genéticos derivados de diferentes organismos que no pueden cruzarse por medios naturales [90], [91]. Esta reserva a menudo está vinculada a una noción de respeto por la naturaleza y también puede estar relacionada con el temor a los riesgos potenciales para la salud y la propagación de nuevas combinaciones de genes en el medio ambiente.

Con el objetivo de cumplir con estas reservas y al mismo tiempo asegurando una planta ambientalmente racional y una producción de cultivos eficientes, fueron desarrollados otros conceptos de transformación como es el caso de la cisgénesis e intragénesis como alternativas al desarrollo de cultivos transgénicos.

Si el gen donante y todas las secuencias reguladoras del transgén pertenecen a la misma especie de cultivo o pertenecen a las especies de reproducción cruzada del huésped, el cultivo resultante se denomina "cisgénico". En la tecnología cisgénica, el cisgen debe ser una copia idéntica del gen nativo del organismo hospedador, incluyendo sus secuencias reguladoras (promotor y terminador). Por otro lado, un cultivo intragénico se obtiene a partir de la inserción de genes que contienen secuencias genéticas también presentes en el organismo hospedador. En este caso, las secuencias codificantes (con o sin intrones), pueden estar reguladas por promotores y terminadores provenientes de diferentes genes (de especies compatibles sexualmente), generando nuevas combinaciones que no están presentes como tal en el acervo genético del cual provienen pero sí contiene las secuencias que se pueden obtener por cruzamientos convencionales [92], [93], [94] (Figura 4). Haciendo referencia al

esquema de la figura, para obtener un cisgénico se puede seleccionar cualquiera de los cuatro genes identificados en la parte (a), sin modificar su secuencia (promotor- gen intacto-terminador) e insertarlo en una especie compatible sexualmente con la especie de la cual provienen. Para la construcción de intragénicos representado en la Figura 4, se pueden combinar secuencias de la misma especie o de especies compatibles sexualmente con la de interés a transformar, como es el caso del promotor del Gen 2, la secuencia codificante del Gen 1 (sin intrones) y el terminador del Gen 3.

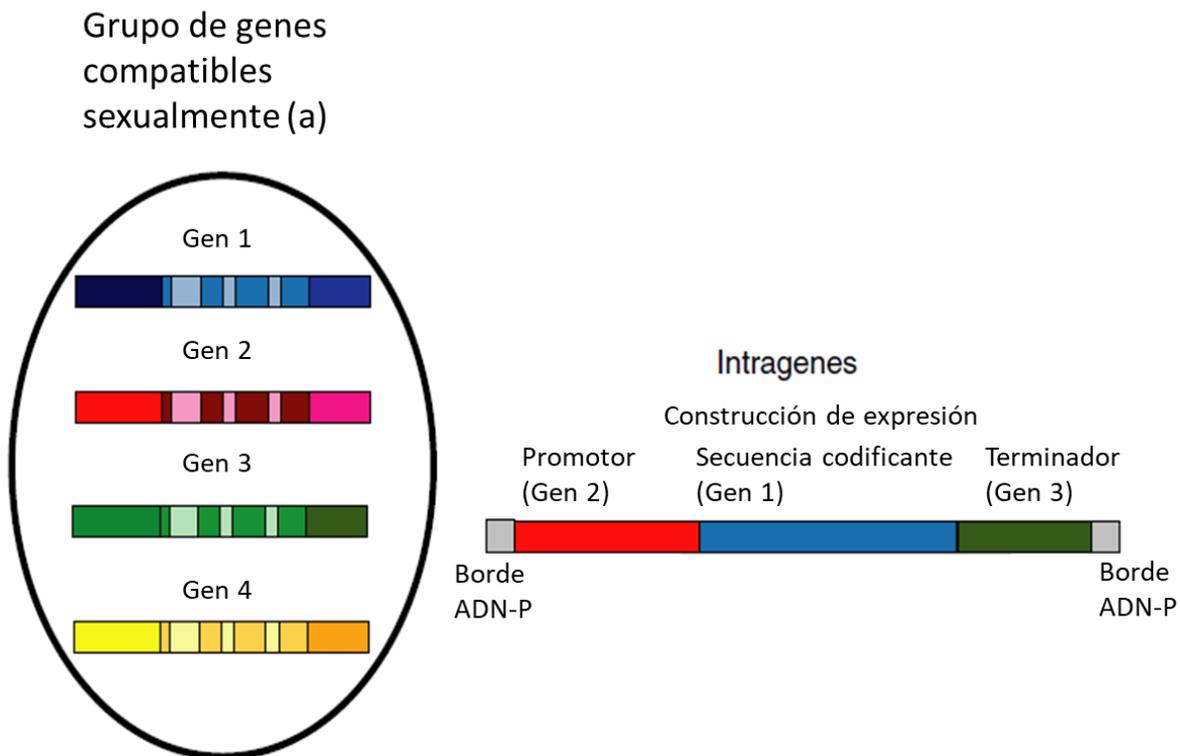


Figura 4: Ilustración de construcción de intragénicos definida por Rommens (2004). La intragénesis permite la recombinación in vitro de elementos aislados de diferentes genes dentro del conjunto de genes sexualmente compatibles.

El conjunto de genes usado para la intragénesis debe ser idéntico al usado en el mejoramiento tradicional, esto significa que no deben ser modificadas sus secuencias. Los genes foráneos como los marcadores de selección y el resto de los genes del esqueleto del vector deben ser eliminados de los transformantes intragénicos primarios o de su progenie.

En resumen, las combinaciones de las secuencias de ADN en la cisgénesis y la intragénesis se realizan igual que en los transgénicos, a través de las herramientas de ADN recombinante, que permiten (de forma resumida) aislar las secuencias deseadas, pegarlas e insertarlas en vectores adecuados que luego serán usados dependiendo del método de transformación que corresponda para modificar genéticamente la especie vegetal objetivo.

6.4.2 Edición genómica - sistema CRISPR/Cas9

Desde el comienzo en el uso de la transgénesis para la modificación genética de plantas y animales, ha existido un gran interés a nivel de la comunidad científica internacional en el desarrollo de procedimientos que permitan efectuar cambios dirigidos en el genoma. En la última década se ha desarrollado un conjunto de tecnologías, colectivamente llamadas de edición genómica, que permiten modificar una región definida del genoma. Esto se logra mediante la introducción de cortes específicos en la doble cadena de ADN, lo cual induce los mecanismos de reparación del ADN y generando cambios en la secuencia afectada [95].

Una de las ventajas de la edición genómica frente a las técnicas convencionales de mutagénesis o de transgénesis convencional, es que las mutaciones generadas mediante esta tecnología son muchas veces indistinguibles de la variación genética que ocurre naturalmente dentro de una especie. A su vez, esta tecnología permite la obtención de mutaciones homocigotas desde las primeras etapas del procedimiento, facilitando la selección de caracteres recesivos [96], [97]

Las técnicas de edición dirigida del genoma pueden generar pequeñas deleciones o inserciones (indels), pudiendo resultar en la pérdida de función de una proteína. También, es posible dirigir la inserción de una nueva secuencia a un locus específico del genoma (en inglés: “knockin”), o incluso, regular la transcripción de genes a partir de la utilización de variantes del sistema que, sin generar un daño en el ADN, permiten la unión de diferentes proteínas a regiones específicas [98], [99]. En comparación con las tecnologías de transgénesis convencionales, la edición genómica, como por ejemplo CRISPR/Cas9 (Del inglés: clustered regularly interspaced short palindromic repeats) tiene marcadas ventajas con respecto a otras tecnologías previas (ZNF, del inglés: “zinc finger nuclease” y TALEN, del inglés “transcriptional activator-like effector nuclease”), como el fácil diseño y construcción, elevada precisión y eficiencia de modificaciones, capacidad de apilar múltiples genes de interés simultáneamente y generación de descendientes sin elementos transgénicos.

La ingeniería dirigida del genoma ha atraído gran atención de los científicos que investigan en plantas y de los mejoradores, y ha sido rápidamente adoptada en el mejoramiento de cultivos, especialmente desde el surgimiento en 2013 del sistema CRISPR/Cas9.

Varios países, entre los cuales se encuentran EUA, Argentina, Brasil y Chile, han adoptado la resolución de considerar a los cultivos editados como variedades convencionales, siempre y cuando se demuestre que no contienen secuencias de ADN de otra especie. Cabe destacar que, para generar un individuo editado, en la mayoría de los casos, es necesario utilizar la transgénesis como estrategia para introducir el sistema de edición genética a las células vegetales. En esos casos, es indispensable eliminar el ADN transgénico post transformación, como el marcador de selección y los módulos de expresión de la proteína Cas, así como los otros componentes del sistema de edición genética.

Actualmente, las plantas intragénicas/cisgénicas están reguladas como plantas transgénicas en todo el mundo. Sin embargo, como el acervo genético explotado por la intragénesis y la cisgénesis es idéntico al acervo genético disponible para mejoramiento convencional, es esperable que en un futuro estos organismos sean sometidos a medidas reglamentarias menos estrictas. La regulación de los cultivos intragénicos/cisgénicos se encuentran actualmente bajo evaluación en la Unión Europea y en EUA, y es posible que al menos un subgrupo de estos cultivos pueda estar exento de regulación [94]. En este contexto, resulta particularmente interesante el desarrollo y optimización de metodologías eficientes para la transformación de soja. Estas permitirán el empleo de estrategias de mejoramiento basadas tanto en la edición del genoma como en la cisgénesis/intragénesis.

6.4.3 Sistemas de eliminación de secuencias de ADN no deseadas

Existen varias herramientas que pueden ayudar a eliminar las regiones no deseadas y transgénicas como los genes marcadores de selección una vez culminado el proceso de transformación genética y que son seleccionados los eventos transformados.

6.4.3.1 Sistema de 2 vectores

El uso del sistema de dos vectores, durante la manipulación genética, es uno de los métodos de transformación más favorables en el desarrollo de las plantas transgénicas libres de marcadores [100], [101]. Un vector contiene el gen de interés mientras que el otro contiene el gen marcador. Los explantes son cocultivados con dos cepas de *Agrobacterium* que sólo difieren en que cada una contiene uno de dichos vectores. La transformación por este método puede resultar en tres combinaciones:

- a) Un conjunto de transformantes que alberga sólo el gen marcador.
- b) Otro conjunto con sólo el gen candidato.
- c) Una tercera posibilidad donde el gen candidato y el marcador están ambos presentes, pero en diferentes loci dentro del genoma de la planta transformada.

Los transformantes que exhiben la primera y la tercera combinación son evaluados en un medio selectivo. Además, son identificados por una reacción de PCR gen específico para seleccionar los transformantes con la tercera combinación. Luego se segregan y se seleccionan los transformantes que contengan solamente el gen de interés. Las líneas transgénicas que contienen solamente el gen candidato son obtenidas como el producto final y son denominadas líneas transgénicas libres de marcadores [102].

6.4.3.2 Co-transformación mediada por transposones

Los transposones son fragmentos de ADN inestables que pueden cambiar sus posiciones dentro del genoma. Estos están siendo muy usados para la generación de plantas transgénicas libres de marcadores.

La estrategia hace uso del sistema de transposición Ac / Ds y se basa principalmente en el hecho de que las secuencias de ADN ubicadas en las repeticiones Ds pueden translocarse para eliminarlas junto con el elemento Ds [103]. Este método involucra la transformación mediada por *Agrobacterium* seguido de la re-localización intragenómica del transgén de interés. Subsecuentemente la segregación del marcador de selección en la progenie o la escisión directa del gen marcador del genoma.

La principal ventaja de esta estrategia es que las plantas transgénicas libres de marcadores se pueden seleccionar fácilmente en la generación T₀, evitando la necesidad de reproducción sexual e indicando la aplicabilidad de la estrategia también a los cultivos propagados vegetativamente. A pesar de todas las ventajas, algunas limitaciones son inevitables, como la muy baja frecuencia de regeneración de plantas transgénicas libres de marcadores y la inestabilidad genómica de las plantas transgénicas debido a la presencia continua de transposones heterólogos. El requisito de cruzamiento y segregación genética para separar el transgén y el gen marcador es un proceso que requiere mucho tiempo y, por tanto, puede contarse como uno de los inconvenientes de este método.

6.4.3.3 Recombinación sitio específica

La recombinación en un sitio de escisión diana se denomina recombinación sitio específica y generalmente se lleva a cabo usando una enzima excisionasa o recombinasa. Esta técnica ha sido muy usada en la eliminación de genes marcadores del genoma de plantas transgénicas. Diferentes tipos de estrategias de recombinación sitio específica han sido desarrolladas para reunir varios cambios en la biotecnología moderna. Recientemente, un sistema de vector de transformación multi-auto-transformación (MATVS) fue usado para desarrollar plantas de tabaco transgénicas libres de marcador, donde la enzima RDR6 (ARN polimerasa 6 dependiente de ARN) fue suprimida en eventos de modificación postranscripcional [104].

Otros tres sistemas de recombinación sitio específica se encuentran bien caracterizados por la eliminación de los genes marcadores. Estos son, el sistema Cre/loxP del bacteriófago P1 (el más usado), el sistema de recombinación FLP/FRT de *Saccharomyces cerevisiae* y el sistema de recombinación R/RS de *Zygosaccharomyces rouxii*. Estos sistemas tienen en común que los sitios de recombinación son secuencias de longitud entre 30 y 200 nucleótidos y constan de dos motivos con una simetría de repetición invertida parcial. La recombinasa se une a estos motivos, los cuales delimitan a una secuencia transversal en la que tiene lugar la recombinación. Este sistema es frecuentemente referenciado como autoexcisión [105].

Este método puede presentar algunas desventajas o limitaciones como la amplia presencia de recombinasas bacterianas en las plantas, capaces de producir cambios no deseados en el genoma de la planta en los sitios de escisión del transgén. Puede funcionar correctamente en plantas con flores pero no es usada en plantas que se propagan vegetativamente [106].

6.4.4 Sistema Cre//loxP

El sistema Cre//loxP es particularmente simple y está bien caracterizado [107]. Se basa en dos componentes sin requerimientos de otras proteínas: (a) la recombinasa Cre, que cataliza la recombinación entre dos sitios *loxP*, y (b) los sitios *loxP* (del inglés “locus of crossing-over” que significa lugar de entrecruzamiento).

Cuando se expresa la Cre recombinasa, los eventos de recombinación pueden ocurrir en los sitios de reconocimiento *loxP* del genoma de la célula. En general, son tres los posibles resultados de la recombinación Cre//loxP: inversión, translocación o escisión, dependiendo de la orientación de los sitios de recombinación *loxP* (Figura 5). Los eventos de inversión o escisión pueden ocurrir cuando los sitios de recombinación están localizados sobre el mismo cromosoma con la misma orientación u orientación opuesta, respectivamente. Los eventos de translocación pueden resultar del intercambio de segmentos de ADN cuando los dos sitios de recombinación están localizados en cromosomas separados con la misma orientación [108]. Estas son las dos principales aplicaciones del sistema de recombinación sitio específica: remover elementos transgénicos no deseables como los genes marcadores y la integración sitio específica de genes de interés. Por ejemplo, el gen marcador de selección HPT, ha sido eliminado de plantas transgénicas de mostaza con resistencia a insecticida [109]. La eliminación de los genes marcadores han sido reportados en arroz [110], papa [111] y tomate [112], etc.

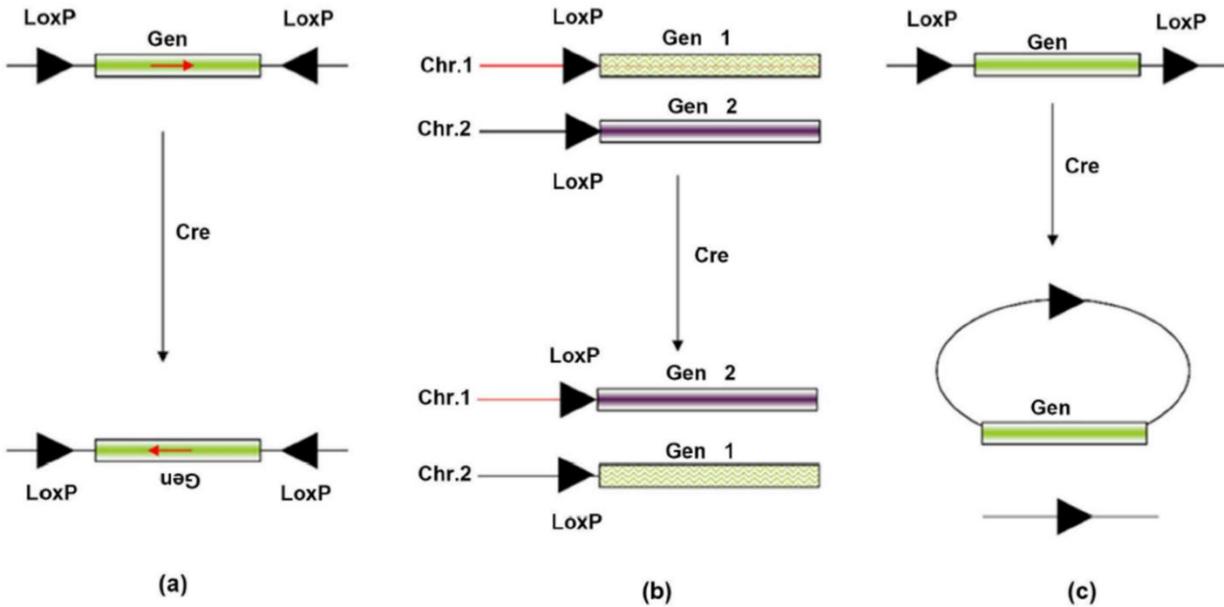


Figura 5: Reacción de recombinación sitio específica mediada por el sistema Cre/loxP. **a)** El evento de inversión mediada por Cre/loxP puede ocurrir cuando los dos sitios loxP están localizados en el mismo cromosoma con orientaciones opuestas. **b)** El evento de translocación mediada por Cre/loxP puede ocurrir cuando los dos sitios loxP están localizados en cromosomas diferentes, pero con la misma orientación. **c)** El evento de escisión mediada por Cre/loxP puede ocurrir cuando los dos sitios loxP están localizados en el mismo cromosoma con la misma orientación. Tomado de (X. Yang, Luo, Mo, & Liu, 2019).

La Cre no requiere de la participación de otras proteínas o cofactores y la actividad enzimática la realiza bajo una amplia variedad de condiciones celulares y no celulares, de forma intra o intermolecularmente (sobre el ADN). La reacción de recombinación es reversible. La reacción de escisión es irreversible y cinéticamente más favorable que la integración bimolecular [113], [114].

Son diferentes los métodos de expresión de Cre en diferentes especies de plantas, entre las que se encuentran *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana* y soja, con diferentes eficiencias de corte [115].

Una herramienta que permite la expresión temporal de Cre, inducible químicamente por estradiol, fue desarrollada por Zuo y colaboradores en el 2000 [116] y evaluada en *Arabidopsis* con una eficiencia de corte de hasta un 66%. Esta metodología permite controlar estrictamente la expresión de una proteína deseada como puede ser la Cre recombinasa y puede ser muy útil para eliminar el sistema CRISPR/Cas9 una vez generada la mutación deseada si se agrega un sitio loxP delante del casete CRISPR/Cas9.

6.5 Antecedentes del grupo de trabajo

La mejora de la tolerancia al estrés ambiental en plantas es compleja además de no ser prioritaria para las grandes empresas biotecnológicas del sector de producción de semillas de soja. Esto condiciona que la obtención de variedades tolerantes a estrés ambiental deba enmarcarse con recursos a nivel país. Existen diferentes eventos de soja transgénica contra el estrés biótico, pero hay pocos avances en este cultivo en la resistencia a estrés abiótico por sequía. En este contexto, el mejoramiento genético mediante el desarrollo de material tolerante al tipo de sequía que se da regularmente en Uruguay, representa una importante oportunidad.

En el marco del proyecto “Aproximación genómica integrada en el MERCOSUR para la prospección de genes útiles para el mejoramiento de la soja frente a estrés biótico y abiótico”, Biotecsur, financiado por la Unión Europea, nuestro grupo se centró en la identificación de genes candidatos para aumentar la tolerancia al déficit hídrico en soja. Como resultado de estos estudios se identificaron varios genes de respuesta a sequía. Estos genes mostraron un claro patrón de expresión diferencial entre los genotipos tolerantes y susceptibles. Además, se evaluó su función en la tolerancia al estrés hídrico utilizando como modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*.

Como continuidad de este trabajo, nuestro laboratorio en conjunto con el INIA y la Facultad de Agronomía desarrolló el proyecto “Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de la soja”. Dicho proyecto tiene como objetivo obtener líneas intragénicas de soja más tolerantes a la sequía; utilizando el sistema Cre/loxP para eliminar las secuencias de ADN no deseadas presentes en las construcciones usadas para la transformación. Las nuevas variantes genéticas de soja generadas podrán ingresar al programa de mejoramiento genético de soja de INIA y podrán ser usadas para cruzamiento con otras variedades.

7 Objetivos

7.1 Objetivo general

Desarrollar un sistema de vectores para la transformación de soja que permita la obtención de genotipos intragénicos con expresión constitutiva o inducible de genes candidatos.

7.2 Objetivos específicos:

- 1) Identificar promotores de genes de soja, tanto de expresión constitutiva como de respuesta al déficit hídrico.
- 2) Generar vectores para la expresión génica constitutiva e inducible por sequía, conteniendo un sistema para la eliminación de secuencias no deseadas en etapas post transformación.
- 3) Caracterizar los vectores para la expresión génica constitutiva e inducible en plantas modelo y soja.

8 Estrategia experimental

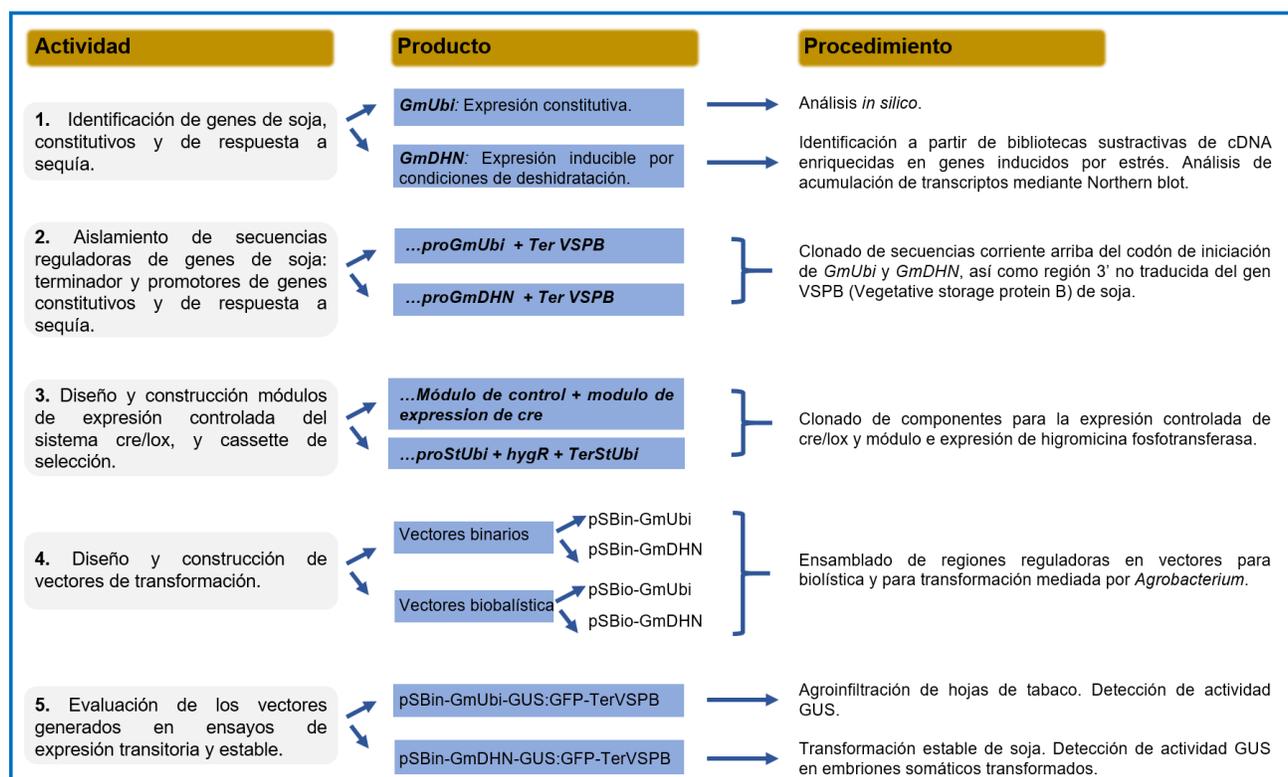
La estrategia general del trabajo se ilustra de manera esquemática en la Figura 6. Con el objetivo de generar un sistema de vectores para la transformación de soja y obtención de genotipos intragénicos, en primer lugar, se identificaron genes de esta especie, cuyos promotores pudieran ser útiles para dirigir la expresión de otros genes, en forma constitutiva o inducible por estrés hídrico (Actividad 1). Para la búsqueda de genes candidatos, se usaron datos generales de transcriptómica, datos bibliográficos, y resultados previos del grupo obtenidos a partir de bibliotecas de ADNc, sustraídas y enriquecidas en secuencias inducidas por déficit hídrico.

Las regiones del promotor de estos genes, junto con la secuencia 3' no traducida del gen *VspB* de soja, fueron aisladas y clonadas en vectores, junto con una región de múltiple clonado, para formar módulos de expresión (Actividad 2).

Se generaron vectores de transformación de soja (binarios y para biolística), conteniendo el sistema *Cre/loxP* para la escisión controlada del módulo de selección y del propio sistema *Cre/loxP*. Esto permite la eliminación de las secuencias de ADN no deseadas, una vez seleccionados los genotipos transformantes (Actividad 3).

Los módulos de expresión de regulación de la expresión de genes, junto con las secuencias correspondientes al sistema *Cre/loxP* y el casete de selección, fueron ensamblados para formar vectores de tipo binarios y para biolística (Actividad 4). Estos vectores fueron evaluados mediante la expresión transitoria del gen reportero GUS, en soja y en plantas modelo. A su vez, se generaron plantas transgénicas de soja estables para contribuir a un análisis más detallado acerca de la aplicabilidad de estos sistemas de vectores (Actividad 5).

Figura 6: Representación esquemática de la estrategia utilizada en este proyecto.



9 Materiales y métodos

9.1 Material vegetal, condiciones de cultivo

Plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron utilizadas en los ensayos de expresión transitoria mediante agroinfiltración de hojas.

Los genotipos de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) utilizados para los ensayos de expresión de genes mediante Northern blot fueron: N7001[30], TJS2049 [117] y Munasqa [118]. Los genotipos de soja transformados mediante biolística fueron el cultivar Jack [119] y la línea avanzada de mejoramiento (SJ14241) de INIA, La Estanzuela.

Del genotipo de soja N7001 [30] de marchitamiento lento se aislaron secuencias reguladoras para la construcción de los vectores.

9.1.1 Condiciones del cultivo

Para la transformación transitoria de soja, se utilizaron plántulas obtenidas a partir de semillas previamente incubadas durante 16 h (ON, del inglés “over night”) con gas cloro (apartado 9.2.2), y germinadas *in vitro* en medio MS (1/2) [120] con un pH 5.7 y 0.7% agar.

Las plantas de soja utilizadas para producción de embriones somáticos a partir de las semillas inmaduras fueron cultivadas con una intensidad de luz de 800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ alcanzada con el aporte combinado de lámparas de halogenuro metálico de 200 W y lámparas de vapor de sodio a alta presión de 400 W, utilizando un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) y a una temperatura de 30°C/20°C (día/noche).

9.2 Desinfección de semillas para germinación *in vitro*

9.2.1 Semillas de *Nicotiana benthamiana*

Las semillas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) se desinfectaron mediante incubación durante 3 min con etanol 70% y posteriormente durante 15 min con una solución de hipoclorito de sodio 25% y Tritón 0,1%. Posteriormente, se realizaron de 5 a 7 enjuagues con agua destilada estéril para eliminar los restos de estas soluciones.

9.2.2 Semillas de Soja

Las semillas de soja fueron desinfectadas mediante exposición al gas Cl₂, colocándolas en un recipiente abierto dentro de un desecador de vidrio junto a un vaso de bohemia con una mezcla de 50 mL de hipoclorito de sodio 100%, 50 mL de agua destilada y 3,5 mL de HCl 32%. La mezcla del ácido clorhídrico con el hipoclorito de sodio generó gas Cl₂ que esterilizó las semillas incubándolas ON con el desecador cerrado. El desecador se abrió en cabina de flujo laminar para sacar las semillas en condiciones asépticas y se dejó abierto 30 min antes de proceder con la siembra *in vitro* en MS (1/2).

9.3 Cepas de bacterias y condiciones de cultivo

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos

Cepas bacterianas	Genotipo	Plásmidos	Marcador relevante	Referencias
<i>Escherichia coli</i>				
HB101 (helper)	F ⁻ , thi-1, hsdS20 (rB ⁻ , mB ⁻), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (strr), xyl-5, mtl-1.	pRK2013	KanR	ATCC
DB 3.1	gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 glnV44 (=supE44) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl5 leuB6 mtl1	---	ccdB ^r /Strep ^r	Invitrogen
DH5α	F ⁻ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻	---	---	Invitrogen
TOP10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	---	Strep ^r	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>				
GV3101 (gentR/strepR) Nopalina	---	Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA)	C58C1 Rif ^r /Strep ^r	[121]

9.3.1 Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas

Las cepas de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) fueron cultivadas en medio líquido LB e incubadas a 37°C con agitación (120 rpm) ON.

Las colonias de bacterias transformados con los diferentes vectores fueron seleccionadas en medio sólido LB con el agregado del antibiótico específico para los clones transformantes e incubadas en estufa a 37°C ON.

La fórmula del medio LB Agar bajo en concentración de sales comprendió 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl disueltos en un litro de agua destilada y un pH de entre 7,5 y 8. Para solidificar el medio se agregó 15 g/L de agar.

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), fueron crecidas en medios LB sólidos o líquidos con la suplementación de antibióticos, a una temperatura de 28°C en medio sólido durante dos días y en medio líquido ON.

9.4 Análisis de expresión génica mediante Northern Blot

El ARN total (15 µg) extraído según se indica en la sección 9.12.4, fue separado en geles de agarosa desnaturalizantes con formaldehído 2.2 M, utilizando el buffer 1X MOPS para la corrida electroforética, (sección 9.12.4). La transferencia del ARN a membranas de nylon (Amersham Hybond-N+, GE Health Care, Buckinghamshire NA) se realizó en solución 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M Citrato de sodio). Las muestras de ARN fueron fijadas a las membranas por exposición a luz ultravioleta (70.000 µJ/cm², 5 seg) utilizando un crosslinker (Hoefer UVC 500 Ultraviolet Crosslinker). Las membranas fueron prehibridadas 4 h e hibridadas ON a 65°C en solución Denhardt (5X SSC, 0.2% SDS, 5X Denhardt's y 500 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado). Se agregaron 50 ng de sondas de ADN desnaturalizadas, marcadas con [α -32P] dCTP y se hibridó ON. Las membranas fueron lavadas a 65°C dos veces durante 40 min con 5X SSC, 0.5% SDS y 2 veces con 1X SSC, 0.5% SDS a 65°C. El revelado se realizó por medio de películas de autoradiografía KODAK a -80°C (en ultrafreezer), así como con el equipo Fuji Imager FLA-3000. Los insertos se purificaron a partir de los geles utilizando el Quiagen Gel extraction Kit (Quiagen, Hilden, Germany). Se marcaron 50 ng de ADN con [α -32P] dCTP 50 µCi, 3000 Ci/mmol (MP Biomedicals, USA) usando el kit Amersham Rediprime II DNA Labeling System (GE Health Care, Buckinghamshire NA). Las sondas se purificaron con columnas de exclusión cromatográfica Illustra MicroSpin G-25 Columns (GE Health Care, Buckinghamshire NA).

9.4.1 Estudio de expresión génica del gen de soja GmDHN-27kDa

Para estudiar el perfil de expresión génica de GmDHN-27kDa, se efectuaron ensayos de Northern blot a partir de muestras de ARN total obtenidas de 3 genotipos de soja diferentes, los cultivares N7001, TJS2049 y Munasqa, que presentan comportamientos contrastantes frente a condiciones de sequía. La extracción del ARN total de los tres genotipos se realizó en estadio V2 (vegetativo 2: segundo trifolio expandido), tanto en hojas como en raíces y frente

a distintos tratamientos. A su vez, se extrajo ARN a partir de semillas (S), cotiledones (C) y embriones (E) del genotipo N7001.

Entre los tratamientos realizados, se incluyó el agregado de las hormonas ácido salicílico (SA) 2 mM y ABA 2uM. A su vez, las plantas fueron tratadas con el herbicida paraquat (Pq - metilviológeno) a la concentración de 1uM. Así mismo, las plantas fueron sometidas a un estrés por deshidratación mediante la interrupción del riego hasta llegar a una capacidad hídrica del sustrato del 50% (3 días).

Se extrajeron muestras de ARN total a partir de plantas sometidas a los tratamientos antes mencionados, tanto de las hojas como de las raíces. Las muestras, de 10 µg de ARN, fueron separadas en geles de agarosa desnaturalizantes, transferidas a membranas de nylon, las cuales fueron incubadas posteriormente con una sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP.

La sonda fue preparada a partir de la purificación del inserto de un clon de la biblioteca sustraída [122], que corresponde a la secuencia de cDNA comprendida entre las posiciones +588 y +763 del sitio de inicio de la traducción del gen.

9.5 Aislamiento de regiones reguladoras de genes de soja

9.5.1 Promotor del gen ubiquitina (GmUbi)

El promotor de poliubiquitina, pGmUbi (GenBank: EU310508.1) de 917 pb fue amplificado a partir de ADN genómico de soja variedad N7001, con los cebadores FGmubi-1001 y RGmUbi-3 (secuencias en Tabla 15 de la sección “Anexos”) mediante la reacción de PCR que se muestra en la Tabla 2. El amplicón fue clonado en el vector intermediario pCR-Blunt II- TOPO de Invitrogen y secuenciado.

Tabla 2: Condiciones de PCR para amplificar el promotor de poliubiquitina de soja a partir de ADN genómico.

Gen o vector	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplicón (pb)	Polimerasa
pGmUbi	FGmubi-1001 RGmUbi-3	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 35 ciclos de 20 seg. a 98°C, 15 seg. a 55°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min. a 72°C de extensión final	1148	Kapa Hifi Hot Start

9.5.2 Promotor del gen dehidrina (GmDHN)

Para clonar el promotor del gen de dehidrina se analizó una secuencia de 2000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción del gen Glyma.09G185500, presente en la base de datos de *Phytozome*.

Se diseñó un par de cebadores (FoGmDHN2 y ReGmDHN2) cuyas secuencias se presentan en la Tabla 15 de la sección “Anexos”, para amplificar una región de 1414 pb de promotor, a partir de ADN genómico de la variedad de soja N7001 (Tabla 3).

Tabla 3: Condiciones de PCR para amplificar el promotor de Dehidrina de soja

Gen	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplicón (pb)	Polimerasa
pGmDHN	ReGmDHN2 FoGmDHN2	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 35 ciclos de 15 seg. a 95°C, 15 seg. a 60°C, 3 min. a 72°C; 1 ciclo de 7 min. a 72°C de extensión final	1414	Kapa Hifi Hot Start

El fragmento amplificado fue adenilado en sus extremos mediante una reacción en presencia de 2mM de dATP y 5U (unidades de enzima) de Taq polimerasa, la cual fue incubada durante 10 minutos a 72°C. El amplicón fue purificado utilizando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), y clonado por ligación en un vector T/A pCR 2.1 de Invitrogen. Se transformaron células quimiocompetentes TOP10. Las colonias positivas fueron seleccionadas en presencia de ampicilina y analizadas para la presencia del inserto mediante restricción con *EcoRI*.

9.5.3 3'UTR (terminador) del gen *VspB*

La secuencia terminadora (3' UTR), del gen de la proteína de almacenamiento vacuolar -B (vacuolar storage protein B) de soja tVspB fue amplificada por PCR (ver Tabla 4) a partir de ADN genómico de la variedad William 82 con los cebadores F-vspB y R-vspB (Tabla 15 en anexos). El fragmento resultante fue clonado en el vector pCR-Blunt II- TOPO de Invitrogen y las colonias resultantes fueron seleccionadas en presencia de kanamicina y analizadas por restricción con *EcoRI*. De esta transformación se seleccionó el clon tGmVspB_3. En todos los casos, los clones resultantes fueron secuenciados.

Tabla 4: Condiciones de PCR para amplificar el terminador *VspB* de soja

Gen o vector	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplicón (pb)	Polimerasa
tGmVspB	F-VspB R-VspB	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 40 ciclos de 25 seg. a 98°C, 30 seg. a 59°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min. a 72°C de extensión final	592	Kapa Hifi Hot Start

9.6 Genes reporteros

9.6.1 GUS-int

El gen reportero *GUS* que codifica para la enzima β - glucuronidasa conteniendo un intrón de maíz, fue amplificado a partir del vector pSHGus-int (Vidal S, sin publicar) con los cebadores gus_FW y gus_RV (Tabla 15) mediante una reacción de PCR. Las condiciones en las cuales se llevó a cabo la reacción de amplificación se muestran en la Tabla 6. El amplicón *GUS-int* fue clonado en el vector intermediario pCR-Blunt II- TOPO de Invitrogen, de acuerdo con las

indicaciones del proveedor, e introducido en células quimiocompetentes TOP10. Los clones resultantes fueron secuenciados para verificar la ausencia de mutaciones.

Tabla 5: Condiciones de PCR para amplificar el gen reportero *Gus-int*

Gen o vector	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplicón (pb)	Polimerasa
<i>GUS-int</i>	<i>gus_FW</i> <i>gus_RV</i>	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 5 ciclos de 20 seg. a 98°C, 15 seg. a 55°C, 2 min. a 72°C; 30 ciclos de 20 seg. a 98°C, 15 seg. a 68°C, 2 min. a 72°C; 1 ciclo de 7 min. a 72°C de extensión final	2140	Kapa Hifi Hot Start

9.6.2 eGFP-GUS

El gen reportero quimérico *eGFP-GUS* fue amplificado a partir del vector pBGWFS 7.0 (Karimi, Inzé, & Depicker, 2002) con los cebadores GFP *XhoI-fw* y GFP *Ascl-rv* (Tabla 6 y Tabla 15), conteniendo en sus extremos 5', un sitio de restricción para *XhoI* o *AsclI*, respectivamente, mediante una reacción de PCR. Las condiciones en las cuales se llevó a cabo la reacción de amplificación se muestran en la Tabla 6. El amplicón 5'-*XhoI-eGFP-GUS-AsclI*, fue clonado en un vector intermediario (pCR2.1, Invitrogen) e introducido en células quimiocompetentes TOP10. Los clones resultantes fueron secuenciados para verificar la ausencia de mutaciones.

Tabla 6: Condiciones de reacción por PCR para amplificar la secuencia de *eGFP-GUS* a partir del vector pBGWFS 7.0

Gen	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplicón (pb)	Polimerasa
<i>eGFP-GUS</i>	GFP <i>XhoI-fw</i> (1000) GFP <i>Ascl-rv</i> (1001)	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 5 ciclos de 20 seg. a 98°C, 20 seg. a 62°C, 2 min y 40 seg. a 72°C; 35 ciclos de 20 seg. a 98°C, 20 seg. a 69°C, 2 min. y 40 seg. a 72°C; 1 ciclo de 10 min. a 72°C de extensión final	2900	Kapa Hifi Hot Start

9.7 Construcción del vector pSaby-pGmUbi

Para evaluar la actividad del promotor GmUbi, se generó una construcción conteniendo el gen reportero *GUS_int*, flanqueado por la secuencia del promotor GmUbi y del terminador del gen *VspB*. Estas secuencias fueron introducidas entre el borde derecho y el borde izquierdo del vector pUb-DEST [123], conteniendo el casete de selección al herbicida glifosinato de amonio. Este vector tiene un tamaño de 11136 pb y lo identificamos como pSaby-pGmUbi. Para su obtención se realizó una estrategia basada en la recombinación, utilizando el sistema GENEART Seamless Cloning and Assembly Kit de Invitrogen. Para ello, se diseñaron cebadores conteniendo secuencias solapantes entre cada fragmento y se amplificó por PCR las siguientes secuencias: promotor GmUbi; región codificante del gen *GUS*; región 3' no traducida del gen *VspB*, esqueleto del vector pUB-DEST, conteniendo el casete de resistencia a glifosinato de amonio Tabla 7. La secuencia de los cebadores se presenta en la Tabla 15 de la sección "Anexos".

Tabla 7: Condiciones de reacción de PCR para amplificar las regiones que serán ensambladas usando GENEART.

Gen o vector	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplicón (pb)	Polimerasa
pUB - DEST	pDest_FW pDest_RV	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 35 ciclos de 25 seg. a 98°C, 30 seg. a 55°C, 8 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min. a 72°C de extensión final	7808	Kapa Hifi Hot Start
pGmUbi	pGmUbi_FW pGmUbi_RV	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 35 ciclos de 25 seg. a 98°C, 30 seg. a 55°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min. a 72°C de extensión final	927	Kapa Hifi Hot Start
<i>Gus_int</i>	<i>Gus_int_FW</i> <i>Gus_int_RV</i>	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 35 ciclos de 25 seg. a 98°C, 30 seg. a 55°C, 2 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min. a 72°C de extensión final	1812	Kapa Hifi Hot Start
tVspB	VSPB_Ter_FW VSPB_Ter_RV	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 35 ciclos de 25 seg. a 98°C, 30 seg. a 55°C, 40 seg. a 72°C; 1 ciclo de 10 min. a 72°C de extensión final	589	Kapa Hifi Hot Start

Los fragmentos lineales amplificados por PCR se ensamblaron mediante una reacción enzimática incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos siguiendo las indicaciones del Kit. El producto fue transformado en las células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes.

9.8 Construcción de vectores para biobalística

9.8.1 pSBio-pGmUbi y pSBio-pGmDhn

Para generar un vector conteniendo un sistema de expresión controlada de la recombinasa Cre, sobre el cual clonar el casete de selección en planta (resistencia a higromicina) y los eventuales módulos de expresión de genes candidatos, una región de estos componentes fue sintetizada químicamente y clonada en el vector pBluescript SK (-). Se recurrió a la síntesis química de este fragmento debido a la gran abundancia de sitios de restricción presentes en las secuencias a introducir.

Se diseñó una secuencia conteniendo sitios de restricción únicos para las enzimas *NaeI*, *NotI*, *KpnI*, *XhoI* y *AscI*, ubicados inmediatamente corriente arriba de la secuencia del terminador del gen *VspB*. A su vez, se introdujo la región codificante del gen *cre*, conteniendo un intrón vegetal (*cre-int*), inmediatamente corriente debajo de la secuencia del operón LexA. Este último se colocó en 8 copias, seguido por la secuencia del promotor mínimo (-46) 35S de CaMV. Para la correcta expresión de *cre-int*, se introdujo la región 3' no traducida del gen NOS (nopalina sintetasa) de *A. tumefaciens*. Finalmente, se introdujeron las secuencias LoxP en orientación directa, flanqueando esta secuencia sintética. En los extremos 5' y 3' de la construcción sintética, se introdujeron los sitios de restricción para las enzimas *NaeI* y *Eco53K1*, respectivamente.

El fragmento de ADN sintetizado fue clonado en el vector pBluescript SK (-), entre los sitios *NaeI* y *Eco53K1*, eliminando de esa forma, gran parte de la secuencia correspondiente al origen de replicación del fago F1 y al promotor T7 (Figura 7).

secuencias (promotor y terminador), son utilizadas frecuentemente en vectores de transformación de soja. Para el clonado de esta secuencia, se realizó la digestión por restricción con las enzimas *SpeI*-*PacI*, que permiten extraer el fragmento promotor-*hph* (higromicin fosfotransferasa) y terminador, y clonarlo en los mismos sitios de restricción presentes en el vector, generando la construcción pSBio-HygR.

9.8.1.2 Clonado del módulo de regulación de la expresión de la cre recombinasa

Con el objetivo de generar un sistema inducible de expresión de la cre recombinasa, se utilizó un sistema de expresión inducible por β -estradiol. Para ello, se diseñaron cebadores específicos para la amplificación por PCR un fragmento correspondiente al promotor G10-90, la secuencia codificante de la proteína quimérica XVE y la región 3' no traducida del gen *Rbcs3A* de poroto. Estas secuencias están presentes en el vector pER 8, aportado por el Prof. N-H Chua de Rockefeller University [116].

Se utilizaron los cebadores FW Afe-G10b y RV_Spe_Ter Pcr b (la secuencia de los cebadores se presenta en la Tabla 15 de la sección "Anexos") a los cuales se les introdujo los sitios de restricción para las enzimas *AfeI* y *SpeI* respectivamente, en sus extremos 5' (Tabla 8). El fragmento amplificado por PCR fue clonado en el vector intermediario pCR blunt-topo 2.1 (Invitrogen) e introducido en células de *E. coli* quimiocompetentes TOP10. Los clones resultantes fueron seleccionados en presencia de Kan (50 μ g/mL), aislados y secuenciados. El ADN plasmídico de uno de los clones resultantes fue digerido con *AfeI* y *SpeI* y el fragmento resultante, aislado a partir de un gel de agarosa, fue clonado en los mismos sitios de restricción del vector pSBio-HygR. La construcción resultante: pSBio-HygR-XVE, fue secuenciada para corroborar la correcta inserción y secuencia de los distintos fragmentos incorporados.

Tabla 8: Condiciones de PCR para amplificar el casete de regulación de la expresión de Cre que nombramos como XVE. Estos cebadores permiten el agregado de los sitios *AfeI* y *SpeI* en sus extremos 5'

Gen	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplificación (pb)	Polimerasa
Casete XVE	FW Afe-G10b RV_Spe_Ter Pcr b	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 5 ciclos de 20 seg. a 98°C, 15 seg. a 55°C, 2 min. y 20 seg. a 72°C; 30 ciclos de 20 seg. a 98°C, 15 seg. a 60°C, 2 min. y 20 seg. a 72°C; 1 ciclo de 10 min. a 72°C de extensión final	2221	Kapa Hifi Hot Start

9.8.1.3 Clonación de promotores

La secuencia correspondiente al promotor **pGmUbi** previamente aislado, fue amplificada a partir del vector pSaby-pGmUbi (descrito previamente en la sección 9.7) utilizando los cebadores específicos FW-NotGmUbi-2 y RV-Kpn GmUbi, conteniendo en sus extremos 5', los sitios de restricción para las enzimas *NotI* y *KpnI*, respectivamente. Las condiciones utilizadas para la reacción de amplificación se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Condiciones de reacción de PCR para amplificar el promotor pGmUbi a partir del vector pSaby-pGmUbi

Gen	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplicón (pb)	Polimerasa
pGmUbi	FW- NotGmUbi-2 (23) RV-Kpn GmUbi (24)	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 5 ciclos de 20 seg. a 98°C, 20 seg. a 55°C, 1 min. a 72°C; 30 ciclos de 20 seg. a 98°C, 20 seg. a 60°C, 1 min. a 72°C; 1 ciclo de 7 min. a 72°C de extensión final	917	Kapa Hifi Hot Start

El promotor de dehidrina de soja **pGmDHN** (Glyma.09G185500), fue amplificada a partir de ADN genómico de soja, cultivar N7001, utilizando los cebadores FW-NotGmDHN-1 y RV-KPNGmDHN, conteniendo los sitios de restricción para las enzimas *NotI* y 3'-*KpnI* como se muestra en la Tabla 10. Utilizando estos cebadores se amplificó una secuencia de 1404 pb, correspondiente a la secuencia genómica del gen desde la posición **-1405 a -1** corriente arriba del codón de inicio ATG.

Tabla 10: Condiciones de reacción de PCR para amplificar pGmDhn a partir de ADN genómico de soja N7001

Gen	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplicón (pb)	Polimerasa
pGmDHN	FW-NotGmDHN-1 (25) RV-KPNGmDHN (27)	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 5 ciclos de 20 seg. a 98°C, 20 seg. a 55°C, 2 min. a 72°C; 30 ciclos de 20 seg. a 98°C, 20 seg. a 60°C, 2 min. a 72°C; 1 ciclo de 7 min. a 72°C de extensión final	1404	Kapa Hifi Hot Start

Los fragmentos amplificados ***NotI*-pGmUbi-*KpnI*** (917 pb) y ***NotI*-pGmDHN-*KpnI*** (1404 pb) fueron purificados del gel de agarosa utilizando QIAquick Gel extraction Kit-Qiagen y clonados en el vector pCR-Blunt II- TOPO (Invitrogen), como vector intermediario.

Para clonar estos promotores en el vector pSBio-HygR-XVE, tanto los clones intermediarios, como el vector de destino, fueron digeridos con *NotI* y *KpnI*, y los fragmentos correspondientes a los promotores y el vector fueron ligados entre sí. Las reacciones de ligación fueron transformadas en células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes, y los clones resultantes fueron seleccionados en presencia de ampicilina como agente de selección.

Los clones, conteniendo el promotor de GmUbi o el promotor GmDHN, denominados pSBio-pGmUbi y pSBio-pGmDHN, respectivamente, fueron secuenciados para verificar la correcta inserción de los insertos.

9.8.1.4 Clonado de genes reporteros para evaluar la actividad de las secuencias reguladoras

La secuencia codificante para la proteína quimérica eGFP-GUS de 2900 pb fue digerido con las enzimas *XhoI* y *AsclI*, y clonado en los vectores pSBio-GmUbi y pSBio-GmDHN, previamente digeridos con las mismas enzimas de restricción.

Los clones resultantes fueron analizados mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciados para determinar la correcta inserción del inserto.

9.9 Construcción de vectores binarios

9.9.1 pSBin-pGmUbi

Para introducir las construcciones génicas presentes en los vectores de biolística, en un vector binario, que facilite la transformación de plantas mediada por *A. tumefaciens*, se generó un vector binario base, conteniendo un sitio de restricción para la enzima *AfeI* entre la secuencia del borde derecho y el borde izquierdo del ADN de transferencia. De esta manera, fue posible separar el fragmento correspondiente a la construcción presente en el vector binario, mediante restricción con la enzima *SrfI*, que al igual que *AfeI*, dejó extremos romos luego del corte.

Para introducir el sitio de restricción *AfeI* y eliminar la secuencia de ADN de transferencia presente en el vector binario pUb-dest [123], se amplificó el vector utilizando cebadores (Scaff-fw*AfeI* y Scaff-rv*AfeI*), que reconocen secuencias inmediatamente por dentro de los bordes derecho e izquierdo del ADN de transferencia, conteniendo un sitio de restricción para *AfeI* en su región 5'. Las condiciones de la reacción de PCR utilizadas se muestran en la Tabla 11.

El producto de amplificación fue digerido con *AfeI* e incubado con ligasa T4 para permitir la autoligación.

El vector binario desarmado resultante (pUbidest-desarmado) fue utilizado como esqueleto para introducir las construcciones génicas generadas en los vectores de biolística, mediante ligación de extremos romos en el sitio *AfeI*.

Tabla 11: Condiciones de reacción de PCR utilizadas para amplificar el vector pUbidest- desarmado con un sitio *AfeI* entre los bordes derecho e izquierdo.

Gen	Cebadores	Condiciones de PCR	Amplión (pb)	Polimerasa
Scaffold- <i>AfeI</i>	Scaff-fw <i>AfeI</i> (1006) Scaff-rv <i>AfeI</i> (1007)	1 ciclo de 3 min. a 95°C; 40 ciclos de 20 seg. a 98°C, 20 seg. a 68°C, 6 min. a 72°C; 1 ciclo de 7min. a 72°C de extensión final	6805	Kapa Hifi Hot Start

Los fragmentos ligados en el vector binario fueron introducidos en células quimiocompetentes TOP10 y los clones positivos fueron seleccionados en presencia de espectinomicina (100 µg/mL).

Las construcciones presentes en los vectores binarios fueron introducidas posteriormente en *A. tumefaciens* GV3101 por el método triparental y la presencia de las construcciones fue confirmada mediante aislamiento del plásmido y restricción.

9.10 Transformación de cepas bacterianas

9.10.1 Transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* por choque térmico

Se utilizaron células quimiocompetentes de *E. coli* comerciales o generadas de acuerdo con el protocolo descrito por Inoue en 1990 [125].

Las células de *E. coli* competentes se conservaron a -80°C y se mantuvieron en hielo durante la manipulación con las construcciones génicas a transformar. Una vez que se agregó la reacción de ligación o el plásmido, se mantuvo en hielo durante 30 min. El choque térmico se realizó poniendo la mezcla célula más plásmido o mezcla de ligación, contenida en el tubo a 42°C (bloque térmico) durante 40 seg y de inmediato en hielo nuevamente durante 1 min. Se le agregó 150 μL de medio SOB o LB a temperatura ambiente. El tubo se incubó a 37°C con agitación durante 1 h y se incubó en dos placas con medio más el antibiótico de selección en bacterias. Las placas se incubaron en estufa a 37°C ON y se comprobó que las colonias crecidas tuvieran la construcción de interés.

9.10.2 Transformación de *E. coli* por electroporación

Para transformar *E. coli* también se usaron células electrocompetentes conservadas en alícuotas de 50 μL a -80°C . Para cada transformación se mezclaron en una celda de electroporador (*Gene Pulser Xcell Electroporation System* (BioRad, USA, CA) 5 μL de reacción de ligación con 50 μL de células bacterianas. Se seleccionó el programa de transformación de 2,5V. Se secó la celda y se chequeó que no queden burbujas. Se colocó en el portacelda, se cerró la tapa y se presionó PULSAR. Se corroboró que el voltaje que marca haya sido cercano a 2,5V. Se retiró la celda y se agregaron 150 μL de medio LB, mezclando cuidadosamente y se retiró con la pipeta automática todo el volumen y se colocó en un tubo de 1,5 mL para la recuperación de las bacterias con agitación, durante 1 h a 37°C .

9.10.3 Transformación de *A. tumefaciens* por conjugación triparental

En la mayoría de los experimentos se utilizó la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* (Deblaere et al., 1985).

La introducción del vector binario en *A. tumefaciens* se realizó por conjugación de la cepa de *E. coli* portadora del vector construido, la cepa Helper de *E. coli* que permite la transferencia y la cepa receptora de *A. tumefaciens* [126]. Las tres cepas se estriaron en placas independientes con medio LB y antibióticos adecuados y se incubaron ON, a 37°C *E. coli* y a 28°C *A. tumefaciens*. Posteriormente, se estriaron en una placa con medio LB sin antibióticos, confluyendo en el centro de la misma y se incubó a 28°C durante 2 d o hasta que fue notable

el crecimiento en el área central (Figura 8). Se tomó con el ansa en el centro y se estrió en una nueva placa con medio LB más antibióticos para la selección únicamente de la cepa de *A. tumefaciens* con el vector binario construido.

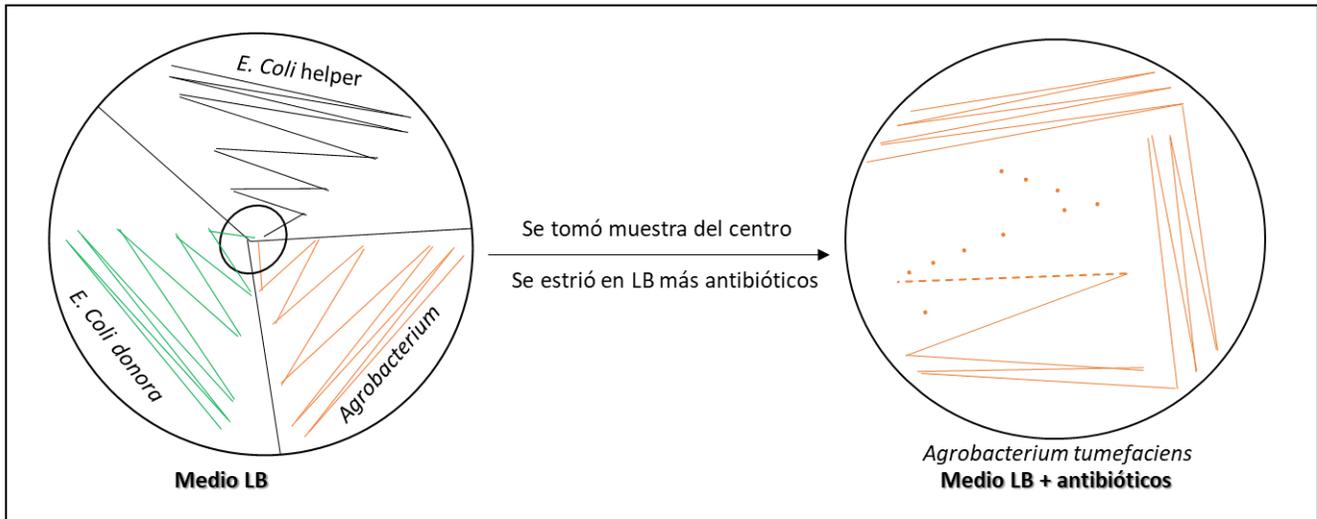


Figura 8: Esquema representativo del método triparental en placas, para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con el vector binario construido por ingeniería genética.

La cepa de *A. tumefaciens* se creció en medio LB con rifampicina 100 µg/mL. La bacteria transformada se selecciona agregando además de rifampicina al medio de cultivo, el antibiótico para el cual generó resistencia el nuevo vector binario que incorporó en la transformación. Posteriormente se purificaron 3 colonias por estría y se corroboró por PCR que estuviera contenido el plásmido de interés.

9.10.4 Análisis de los clones por secuenciación

La secuenciación de los clones (seleccionados por análisis de restricción o PCR) fue realizada por el servicio *Macrogen Inc* (World Meridian Venture Center, Korea, Seoul) o por el servicio del Institut Pasteur de Montevideo con secuenciadores de electroforesis capilar ABI3130 y ABI3500 (Applied Biosystems). Las muestras de ADN se obtuvieron a partir de minipreparaciones de precultivos de *E. coli*.

9.10.5 Preparación del cultivo en glicerol

Las cepas de bacterias con las respectivas construcciones génicas fueron conservadas a -80°C en glicerol. Se mezclaron 500 µL de cultivo celular con 500 µL de glicerol estéril al 80% en condiciones asépticas.

9.10.6 Purificación de ADN de electroforesis

Las moléculas de ADN de interés que fueron corridas en una electroforesis en gel de agarosa se purificaron con el Kit de Qiagen “QIAquick Gel Extraction Kit” [127].

9.10.7 Extracción de plásmidos por lisis alcalina

A partir de las colonias obtenidas se realizaron minipreparaciones de plásmidos utilizando el método de lisis alcalina [128]. Las células se crecieron toda la noche en 5 mL de medio de cultivo LB con el antibiótico adecuado. El precultivo se centrifugó 5 min a 4000 x *g*. El *pellet* bacteriano se resuspendió en 0,3 mL de buffer P1 conservado a 4°C (50 mM tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA y 100 µg/mL de Rnasa). Posteriormente, se agregó 0,3 mL de buffer P2 (200 mM de NaOH; 1% de SDS) y se mezcló invirtiendo el tubo 4 a 6 veces. Antes de transcurrir 5 min a temperatura ambiente se agregó 0,3 mL del buffer P3 (3.0 M de acetato de potasio pH 5.5), se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo e incubó durante 5 minutos en hielo. La centrifugación se realizó a 13000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se recuperó pasándolo a un tubo limpio. El ADN se precipitó agregando 0,7 volúmenes de isopropanol y se invirtió el tubo 4 o 5 veces para luego centrifugar durante 20 min. Culminado este tiempo se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 mL de etanol 70% (se dejó caer el etanol sin resuspender). Se centrifugó durante 5 min, manteniendo la misma velocidad en cada paso, se descartó todo el etanol y se secó el *pellet*. El *pellet* se resuspendió en 50 µL de agua ultrapura estéril.

El ADN de los clones confirmados positivos de bacterias (un clon por construcción) se purificó por el kit de Miniprep de Quiagen “Qiaprep Spin Cat N° 27106. De esta manera se obtuvo material genético de alta pureza para continuar clonando sobre los vectores construidos.

Para los vectores synt, pUbi-Dest, que son vectores relevantes como base para otras construcciones, se procedió a purificar mayor cantidad de ADN de alta pureza a través del Kit de Midiprep de Invitrogen.

9.11 Transformación genética de plantas

9.11.1 Agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana*

Para cada construcción se inocularon 5 mL de medio YEP con 100 µg/mL de rifamicina, carbenicilina y espectinomicina, con cultivos frescos (1 o 2 d) de *A. tumefaciens*. El crecimiento se realizó en agitación a 200 rpm a 28°C ON. Antes de infiltrar se pulverizaron las plantas con agua destilada y se colocaron bajo luces para que los estomas se abrieran. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 2200g por 5 min a temperatura ambiente. Se resuspendió el *pellet* en 1 mL de buffer de infiltración (50 mM MES pH 5.6, 2 mM Na₃PO₄, 0.5% glucosa y 100 µM acetosiringona), se centrifugó y resuspendió nuevamente en 1 mL de buffer de infiltración. Se diluyó la suspensión bacteriana con buffer de infiltración hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0.1. Las infiltraciones se realizaron con jeringas de 5 mL sin aguja, presionando sobre el envés de las hojas. Se realizaron 3 o 4 infiltraciones por construcción. Transcurridos de 3 a 5 d se cortaron discos de hojas y se procedió a realizar el “ensayo histoquímico de la β-glucuronidasa” para evaluar la expresión del gen reportero *GUS* contenido en el vector de transformación.

9.11.2 Transformación transitoria por biolística

Las pruebas de transformación transitoria se realizaron en hojas de puerro como una primera aproximación y en hojas y embriones de soja.

Se prepararon 4 placas con embriones de soja variedad Jack, dos placas para disparar con el vector pSBio-pGmUbi y dos placas para disparar con el vector pSBio-pGmDhn. Después de ser transformadas, se incubaron en medio MSD20 (ver preparación en 9.11.3.5). Una placa de cada construcción se incubó a 25°C durante 24 h y las dos restantes se incubaron durante 5 d a la misma temperatura.

Las hojas de soja después de ser transformadas se incubaron por 24 h y hasta 2 días en la oscuridad.

En el caso de las hojas de puerro, y a diferencia de los embriones, para inducir pGmDhn, se incubaron a 4°C durante 24 h y 5 d en la oscuridad.

9.11.2.1 Construcciones génicas

Para cada una de las pruebas de transformación genética de plantas por biolística se seleccionó el clon 17 del vector pSBio-pGmUbi y el clon 5 del vector pSBio-pGmDhn como los mejores candidatos.

9.11.2.2 Soluciones

Para realizar el procedimiento de transformación por Biolística se prepararon las siguientes soluciones: Agua ultrapura estéril, glicerol 80% (para preparar las concentraciones de trabajo 50% y 25%), espermidina 0,1M (duración máxima de 3 meses), cloruro de calcio 2,5 mM (ambas soluciones se conservaron a -20°C) y etanol absoluto frío.

9.11.2.3 Materiales

Los insumos para operar el dispositivo de biolística (PDS-1000/He 165-2257), fueron los siguientes: helio comprimido (2,500 psi), macrocarriers (Bio-Rad #165-2335), discos de ruptura (e.g. #165-2329), pantallas de detención (# 165-2336).

Los microcarriers fueron: oro, 1 μm ((Bio-Rad #165-2263) o 0,6 μm ((Bio-Rad #165-2262); tungsteno ~1,1 μm de diámetro (Bio-rad #1652267).

9.11.2.4 Recubrimiento de las partículas de tungsteno con ADN (microcarrier)

Se pesaron 50 mg de tungsteno y se lavaron dos veces agregando 1 mL de etanol absoluto. Por cada mL agregado se resuspendió con ayuda del vortex, seguido de 30 seg en baño de ultrasonido y luego se centrifugó a 10000 x g 1 min. Posteriormente, se lavó dos veces en cabina de flujo laminar con agua ultrapura estéril resuspendiendo de igual forma que con el lavado de etanol. Se eliminó toda el agua cuidadosamente y se resuspendió el tungsteno con 1 mL de glicerol 50%.

Se usaron 5 mg de tungsteno, por tanto, se tomaron 100 μL de la suspensión en glicerol 50% y se separaron en tubos identificados con las construcciones a utilizar en la transformación. Por cada tubo con 100 μL de tungsteno en glicerol 50% se agregó 50 μL de ADN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se resuspendió con vortex y ultrasonido. De la mezcla se tomaron 100 μL a un nuevo tubo, se le agregó 65 μL de CaCl_2 a 2,5 M y se resuspendió de igual forma. Se agregó 25 μL de espermidina 0,1 M y se llevó a vortex durante 2 min. Posteriormente, se incubó en hielo durante 20 min y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* (tungsteno más ADN) en 30 μL de etanol absoluto para que se evapore cuando se agregue en el macrocarrier. Se incubó el hielo. Por cada disparo se agregaron 10 μL de la mezcla (tungsteno más ADN en etanol absoluto).

9.11.2.5 Bombardeo de partículas

Antes de comenzar, se desinfectaron los soportes de macrocarriers durante al menos 1 h en EtOH absoluto. Se dejaron en el flujo laminar y se autoclavaron las pantallas de parada.

También se esterilizaron los macrocarries y los discos de ruptura durante al menos 1 h en EtOH absoluto. Los discos de ruptura están clasificados para varias presiones (400, 600, 800, 1000, 1100 y 1200 psi). Estos discos se pueden usar en pares para lograr la presión deseada. En estas transformaciones usamos discos de ruptura de 1100 psi. Antes de ser usadas, se dejaron secar completamente todas las partes esterilizadas con EtOH (excepto los discos de ruptura), y se limpiaron todas las piezas del dispositivo de biolística a fondo con 70% EtOH. Todo el procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar.

Para cada disparo se insertó el macrocarrier en su soporte. Se resuspendió la suspensión de ADN con los microcarriers hasta que quedó bien dispersa y se sonicó durante 10-15 seg. Se tomaron 10 µl de la suspensión y se dispersó uniformemente sobre la superficie del macrocarrier. Se dejó evaporar el EtOH completamente. La superficie del macrocarrier se cubrió con oro uniformemente (para embriones estables de soja) y con tungsteno para la transformación transitoria de hojas de soja y de puerro.

Se colocó la placa de Petri que contiene la muestra en el centro del soporte y se insertó en el cuarto estante de la cámara del equipo contando desde arriba, para hojas y embriones de soja y en el tercer estante para hojas de puerro. Se ajustó la presión que llega a la pistola a 1300 psi (200 psi por encima de la resistencia del disco de ruptura). Se realizó el disparo cuando el vacío alcanzó 27-28 pulgadas Hg (pulgadas de mercurio como una medida de presión).

9.11.3 Transformación estable de soja por biolística.

9.11.3.1 Preparación de embriones

Se tomaron embriones (de no más de 9 meses de antigüedad) seleccionados del cultivo en medio de mantenimiento (MSD20). Se colocaron de manera uniforme en un área de 30 mm de diámetro en el centro de una placa de MSD20. Se eliminaron las zonas oxidadas de tejido antes de confeccionar la placa. La placa se preparó 4 d antes de disparar y se abrió en la cámara de flujo 20 min antes del bombardeo.

Alternativamente, se seleccionaron los embriones subcultivados en medio FNL líquido según Finer y Nagasawa (1988) [129] y una modificación posterior del protocolo por Samoylov et al (1998) [130].

Luego del bombardeo, los embriones se separaron en 4 placas de medio FNL sólido durante una semana y sin la adición de un agente de selección. Pasada la semana se transfirieron a matraces conteniendo 35 mL de medio FNL suplementado con 500 mg/L de timetina y 20 mg/L de higromicina, realizando cambio de medio semanalmente durante 6-8 semanas. Transcurrido este tiempo se evidenciaron colonias verdes correspondientes a tejido resistente a higromicina. Se tomaron dichas colonias y se eliminó cualquier tejido muerto. Posteriormente se colocaron las colonias separadas en placas de 6 pocillos conteniendo nuevo medio y se siguieron propagando, cambiando el medio cada 2 semanas, hasta tener una cantidad suficiente de embriones para llevar a la etapa de diferenciación y generación de plántulas.

Luego de 6 semanas de la transformación, se controlaron mediante el ensayo histoquímico con X-Glu (sección 9.12.2) tanto los embriones transformados con pSBio-pGmUbi como pSBio-pGmDhn.

9.11.3.2 Bombardeo: preparación de Microcarriers

Se utilizaron partículas de oro de un diámetro de 1 μm . Las partículas de oro/tungsteno se fraccionaron y recubrieron el mismo día en que se realizan los disparos.

Se colocaron 10 mg de polvo de oro (microcarriers) en un tubo eppendorf y se agregó 1 mL de EtOH absoluto. Se sonicó en baño sonicador 10 seg y se colocó el tubo en hielo durante 30 seg. Este paso se repitió tres veces. Se centrifugó 5 min a 7000 rpm. El etanol fue retirado sin resuspender el *pellet* de metal y se añadió 175 μL de EtOH absoluto a los 10 mg de polvo de oro. Se mezcló con vortex 1 min. Se sonicó la suspensión de 10 a 15 seg, dos veces. Para cada disparo de una determinada construcción, se tomó una alícuota de 35 μL antes de que los microcarriers se asentaran (por cada 10 mg de oro se pueden preparar 5 recubrimientos diferentes). Se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL. Antes de retirar cualquier otra alícuota, se agitó con vortex y se sonicó como se indicó anteriormente. Se centrifugaron todas las alícuotas brevemente (aproximadamente 10 seg) a 10.000 rpm y se retiró el sobrenadante sin levantar el *pellet* metálico.

9.11.3.3 Bombardeo: recubrimiento de las partículas con ADN

Se agregó 1 mL de H₂O ultrapura estéril lentamente y por las paredes del tubo, teniendo cuidado de no resuspender el *pellet* y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm. Posteriormente se retiró el agua sin resuspender el *pellet* y se agregó 25 μL de solución de ADN (6 ng/ μL) al *pellet* metálico y se resuspendieron los microcarriers usando la pipeta automática. Luego se agitaron en el vortex de 2 a 3 seg y se sonicaron de 10 a 15 seg. Antes de comenzar con el siguiente paso, se sonicó el tubo de 10 a 15 seg. Se agregaron 220 μL de H₂O ultrapura estéril y se resuspendió con pipeta. Luego se agitó con vortex de 2 a 3 seg y se sonicó de 10 a 15 seg. Antes de comenzar el siguiente paso, se sonicó el tubo de 5 a 7 seg.

Se agregó 250 μL de CaCl₂ 2,5 M estéril y frío y se resuspendió con la pipeta. Se prosiguió con agitación por vortex de 2 a 3 seg y sonificado de 10 a 15 seg. Antes de comenzar el siguiente paso, se sonicó el tubo de 5 a 7 seg.

Se añadió 50 μL de espermidina 0,1 M fría y se resuspendió con la pipeta. Se agitó con vortex de 2 a 3 seg y se sonicó de 10 a 15 seg. Se mantuvo el tubo en movimiento mientras se avanzaba con los demás alícuotas. Se colocó el tubo en hielo de 2 a 3 min y se agitó con el vórtex. Luego se centrifugó a 500-1000 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante sin dejar secar el *pellet*. Se resuspendió el ADN+microcarriers en 600 μL de EtOH absoluto, luego con vortex de 2 a 3 seg y se sonicó de 7 a 10 seg.

Se centrifugó 5 min a 500-1000 rpm y se descartó el EtOH sin levantar el *pellet*. Posteriormente se resuspendió el mismo en 36 µl de EtOH al 100% y se sonicó de 5 a 7 seg. Los tubos quedaron en hielo 1 h.

9.11.3.4 Bombardeo de partículas

Este procedimiento fue el mismo que para la transformación transitoria por biolística explicado en la sección 9.11.2.5.

9.11.3.5 Medios de cultivo para inducción, mantenimiento y diferenciación de embriones somáticos de soja

Las soluciones stock preparadas para medios de cultivo de embriones somáticos y plantas se resumen en las Figura 9 y Figura 10.

FNL Macro stock: para 1 L	MS micro stock: para 0,5 L	Stock de vitaminas B5: para 1 L
(NH ₄) ₂ SO ₄ 4,63 g KNO ₃ 28,30 g MgSO ₄ .7H ₂ O 3,70 g KH ₂ PO ₄ 1,85 g	H ₃ BO ₃ 3,100 g MnSO ₄ .H ₂ O 8,45 g ZnSO ₄ .7H ₂ O 4,30 g Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,125 g CuSO ₄ .5H ₂ O 0,0125 g CoCl ₂ .6H ₂ O 0,0125 g KI 0,4150 g	Thiamina.HCl 2,50 g Acid. Nicotínico 0,25 g Pyridoxina.HCl 0,25 g Myo-Inositol 25 g Filtrar y alicuotar. Guardar a 4°C
Stock de calcio: para 1 L	Stock de Hierro: para 1 L	Stock de Glutamina: para 500 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O: 44 g	Na ₂ EDTA* 3,730 g Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O 2,780 g	L-glutamina 20 g
Stock de 2-4D:	debe estar completamente disuelto antes de agregar	Esterilizar por filtración y guardar protegido de la luz.
2,4-D 200 mg/L filtrar	Autoclavar y guardar protegido de la luz.	

Todos las soluciones se guardan a 4°C

Figura 9: Soluciones stock preparadas para los medios de cultivo de embriones somáticos y plantas de soja.

MSD40	MSD20	FNL: para 1 L
Sales MS Vitaminas B5 Sacarosa 3% 40 mg/l 2,4-D pH 7,0 Gelrite 0,2%	Sales MS Vitaminas B5 Sacarosa 3% 20 mg/l 2,4-D Asparagina 5mM pH 5,8 Gelrite 0,2%	FN-lite macro 100 ml MS micro 1 ml Ca 6.82 ml Fe 10 ml B5 vitaminas 2 ml Asparagina 1 g 2,4D 25 ml Sacarosa 10 g pH 5.80
SHAM: para 1 L		
FNL macro 100 ml MS micro 1 ml Ca 6,82 ml Fe 10 ml B5 vitaminas 2 ml Metionina 0,149 g	Sacarosa 30 g Sorbitol 30 g pH 5,80 llevar a 900 ml Autoclavar Stock glutamina 110 ml	MS0
		Sales MS Vitaminas B5 Sucrosa 1,5% pH 5,8 Gelrite 0,2%

Ajustar el pH a todas con NaOH 1M

Figura 10: Medios de cultivo de embriones somáticos y plantas de soja.

9.12 Evaluación molecular de líneas transgénicas

9.12.1 Extracción de ADN genómico de plantas

El ADN genómico fue extraído a partir de 100 mg de muestra pulverizada en nitrógeno líquido utilizando 600 µL de buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 9, 500 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA pH 8,1% SDS, 2% PVP40, 0.1% Triton X-100 y 0.3% mercaptoetanol, agregado en el momento). Se mezcló por inversión e incubó durante 30 min a 65 °C, se dejó enfriar, se agregaron 200 µL de 5M acetato de potasio (Kac) pH 6, se incubó en hielo 20 min y se centrifugó 10 min a 13.000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo, se agregaron 600 µL de isopropanol y se incubó en hielo durante 20 min. Posteriormente se centrifugó 5 min a 13.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó con 1 mL de 70% EtOH, se centrifugó 5 min a 13.000 rpm y se dejó secar. El *pellet* se resuspendió en 100 µL de 1X buffer Tango (Fermentas) y se agregó 1 µL de RNAsa A (10 mg/mL) e incubó 1 h a 37°C. Se agregó 100 µL de agua ultrapura y el ADN se extrajo una vez con 1 volumen de fenol y otra vez con 1 volumen de cloroformo. La fase acuosa fue transferida a otro tubo y se agregó 40 µL de 3 M NaAc pH 8 y 180 µL isopropanol. Se centrifugó 20 min a 13.000 rpm, se lavó el *pellet* con 1 mL de 70% EtOH y se resuspendió en 80 µL de agua ultrapura.

9.12.2 Ensayo histoquímico de GUS

La actividad β -glucuronidasa se detectó en los tejidos de interés mediante ensayos histoquímicos según Jefferson 1987 [131]. El tejido se sumergió en una solución conteniendo: 100 mM Tris pH 7, 50 mM NaCl, 2 mM ferrocianuro potásico, 0.5% Tritón X100 y 2 mM del sustrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glucurónico (X-Gluc). Las muestras se sometieron 5 veces a vacío durante 5 min y posteriormente se incubaron ON a 37°C en oscuridad con la solución conteniendo el sustrato de la enzima. Se lavaron las muestras en agua y se eliminó el pigmento de clorofila del tejido mediante pasos sucesivos de lavados en etanol 70% y 95% para poder observar la coloración por la reacción enzimática. El tejido se rehidrató y se mantuvo en agua. En los tejidos donde hay actividad GUS se observa la aparición de color azul debido a la acción de la enzima sobre el sustrato X-Gluc.

9.12.3 Microscopía para detección de GFP

Para la detección de fluorescencia en los tejidos transformados de forma estable o transitoria se usó el estereoscopio de fluorescencia (AXIO ZOOM.V16 de Zeiss).

9.12.4 Extracción de ARN total y mensajero

El ARN total fue extraído a partir de 1 a 2 g de muestra pulverizada en nitrógeno líquido utilizando 6 mL de buffer NTES (0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1% SDS) y 6 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Las muestras se centrifugaron a 5.000 rpm durante 20 min y los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa fueron precipitados con 0,1 volúmenes de acetato de sodio (NaAc) 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol anhidro. Luego de 3 h de incubación a -20°C, las muestras se centrifugaron durante 20 min a 8.000 rpm, a 4°C. El *pellet* se resuspendió en agua ultrapura tratada con 0,1% DEPC (Dietilpirocarbonato) y se transfirió a tubos de microcentrífuga. Se agregó un volumen igual de 4 M LiCl y el ARN se dejó precipitar toda la noche en hielo. Luego, se centrifugó durante 20 min a 14.000 rpm a 4°C, y los sedimentos se resuspendieron en H₂O-DEPC. La concentración y calidad del ARN se estimó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm. El ARN se visualizó resuspendiendo 3 μ g de ARN total en una solución de formaldehído 2,2 M, 50% (v/v) formamida, 1 X buffer MOPS pH 7 (0,2 M MOPS, 0,05 M NaAc y 0,01 M EDTA), bromuro de etidio (BET) 70 ng/ μ L y 1X buffer de carga (buffer de carga 6X: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol y 15% ficol). Las muestras se desnaturalizaron a 55°C durante 10 min y se separaron en geles de agarosa desnaturalizante con 2,2 M formaldehído utilizando 1X MOPS como buffer para la electroforesis.

El ARNm se aisló con el kit *MicroPoly(A)Purist* (Ambion, inc, Austin, TX, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de 400 μ g de ARN total para cada muestra.

10 Resultados y discusión

Este trabajo se centró en la construcción de un sistema de vectores para la transformación de soja, compatibles con el empleo de metodologías de biolística o de transformación mediada por *A. tumefaciens*. El sistema tiene dos particularidades; por un lado, permite la eliminación de secuencias no deseadas de las plantas transformadas, a través de la incorporación del sistema de recombinación Cre/loxP. Por otro lado, los vectores fueron construidos utilizando secuencias de ADN (promotores y terminador) aisladas del genoma de soja, facilitando la obtención de genotipos intragénicos. Finalmente, los vectores para biolística y para *A. tumefaciens* fueron diseñados para permitir el fácil intercambio de las construcciones génicas entre los mismos.

En el diseño de los vectores se incluyeron 4 módulos de expresión correspondientes a:

- 1) un módulo para la expresión constitutiva o inducible de los genes candidatos
- 2) un módulo de regulación de la expresión de la recombinasa Cre
- 3) un módulo para la expresión de Cre
- 4) un módulo para la selección en plantas

10.1 Selección, aislamiento y caracterización de secuencias reguladoras de soja para dirigir la expresión constitutiva o inducible de genes (módulo 1)

Para dirigir la expresión de los genes candidatos se buscaron secuencias promotoras de genes de soja que exhiben una expresión fuerte y constitutiva, así como de genes que se activan en respuesta al déficit hídrico.

Dentro de los promotores constitutivos que se usan en plantas se encuentran los provenientes de virus o los propios de plantas. Los promotores provenientes de genomas virales son muy eficientes para promover la alta expresión de genes en plantas como es el caso del 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV) [132]. Este promotor es el más comúnmente usado para la expresión constitutiva de genes en plantas. No depende de proteínas virales para su activación y es activo tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas [133], [134]. Si bien son muy buenos candidatos para la expresión constitutiva de genes, tiene algunas limitaciones. A pesar de ser ampliamente utilizado para regular la expresión fuerte de genes en plantas, varios trabajos muestran que el promotor 35S tiene mayor probabilidad que otros promotores fuertes provenientes de genes de plantas, de ser reconocidos por componentes de la maquinaria de silenciamiento génico celular y ser inactivados [135]. Bajo el amplio título de “silenciamiento génico transcripcional”, se incluyen mecanismos de inactivación del transgén y el promotor, dependientes o independientes de metilación [136], remodelación de la cromatina y escisión del ADN foráneo, y emparejamiento homólogo o ectópico cuando múltiples copias del transgén se integran en el genoma. El silenciamiento transgénico es

impredecible, pero cuando ocurre, este puede conducir al apagado estable de la actividad génica de toda la planta o afectar la especificidad de un promotor [137]. El silenciamiento, sin embargo, puede ser menor o menos probable cuando los promotores constitutivos usados son de origen vegetal.

Existen varios promotores endógenos de plantas que son utilizados para regular la expresión de transgenes en forma constitutiva y en altos niveles [138], [139]. Algunos de estos promotores fuertes provienen de genes de actina y ubiquitina. La ubiquitina es una de las proteínas conocidas más altamente conservadas. Esta ha sido vinculada con muchos procesos celulares vitales incluido la renovación de proteínas [140], la estructura de la cromatina y la reparación del ADN [141]. Esta proteína es muy abundante en el citoplasma de la mayoría de las células vegetales. Algunos de los genes que codifican ubiquitina son expresados constitutivamente [142] mientras otros se expresan sólo en respuesta a estrés [143], [144].

Uno de los promotores de ubiquitina más utilizados para regular la expresión de transgenes, es el promotor de ubiquitina 1 de maíz (pUbi), mostrando resultados de expresión en protoplastos de maíz pUbi-1:CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) 10 veces superiores que 35S:CAT, pero 10 veces menor en protoplastos de tabaco que 35S:CAT, limitando esta potencial actividad a plantas monocotiledóneas [138], [143], [145].

El promotor del gen *Ubi.U4* (flaqueando el extremo 5' a -263pb) de *Nicotiana glauca* contiene dos elementos en *cis* que parecen ser críticos para la expresión génica. Mutaciones en esos sitios disminuyen significativamente la expresión del transgén [146]. La actividad GUS en las plantas transgénicas con la construcción -263:GUS mostró tres veces más actividad comparado con la construcción CaMV 35S:GUS en los tejidos donde fueron expresados de manera superpuesta. La mayoría de los órganos contenían células o tejidos que expresaban GUS, pero el promotor *Ubi.4* generó una expresión de GUS excepcionalmente alta en células metabólica y mitóticamente activas.

Varios promotores de genes que codifican ubiquitina han sido aislados y caracterizados a partir de especies como *A. thaliana* [147], maíz [148], papa [149], tomate [150], tabaco [146], arroz [151] y soja [152]. La presencia de un intrón principal en su secuencia ha sido estudiada por ser crucial en su función constitutiva, demostrándose que su ausencia disminuye la intensidad de fluorescencia de la proteína GFP en cotiledones de habas bombardeados con la construcción (Chiera et al 2007). Estudios del intrón del promotor de ubiquitina aislado de arroz y tabaco ha demostrado que éste juega un rol fundamental en la fortaleza de la expresión.

10.1.1 Aislamiento del promotor constitutivo de soja y caracterización de su actividad

Chiera y colaboradores en 2007 mostraron que la actividad del promotor de poliubiquitina de soja del gen *GmUbi3* es mayor que la del promotor CaMV35S para dirigir la expresión de genes reporteros en leguminosas [152]. El gen *GmUbi3* pertenece a una familia de 25 genes de ubiquitina de soja. Hernández y García, en el 2010, evaluaron la actividad de 10 secuencias

reguladoras correspondientes a genes de ubiquitina que se identifican en la Figura 11, del GmUbi1 al GmUbi10 [153]. En esta figura se puede visualizar la relación filogenética de esta familia de proteínas y ubicar los 10 genes con respecto al GmUbi 3. Para realizar la evaluación de las 10 secuencias reguladoras, los autores fusionaron a GFP, una región variable de entre 800 y 1500 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de cada gen, y evaluaron la expresión del marcador mediante expresión transitoria en cotiledones de *Phaseolus lunatus* y estable en hairy-roots de soja. La región reguladora del pGmUbi3 de 1438 pb (Glyma20g27950.1) expresó mayor cantidad de GFP con respecto a los nueve promotores estudiados y al promotor CaMV35S usado como control positivo, en el estudio de transformación estable en raíces de soja a través de la transformación con *Agrobacterium rizogenes*.

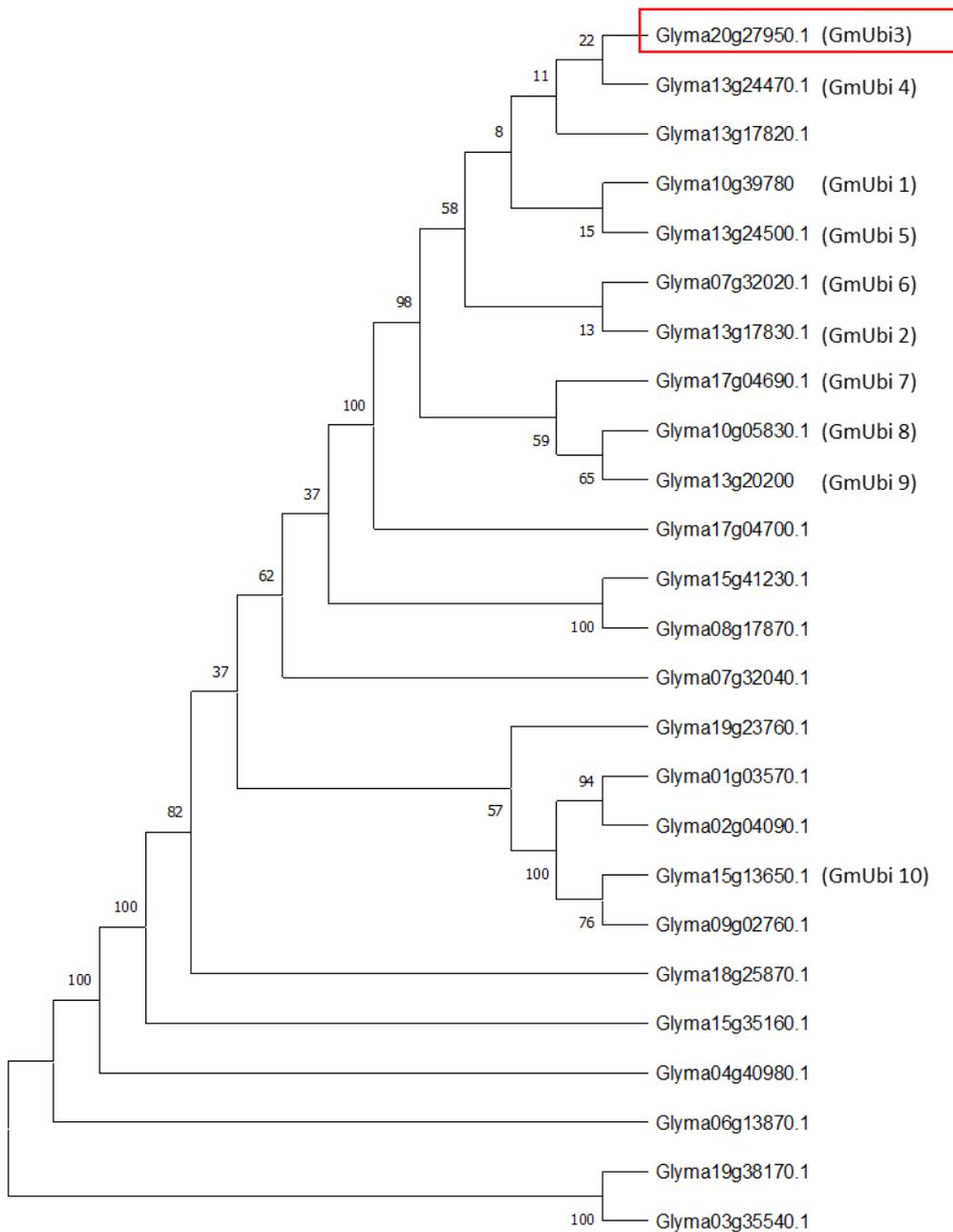


Figura 11: Árbol filogenético de la familia de genes de ubiquitina en soja. Se construyó usando secuencias de aminoácidos de 25 genes que codifican para una unidad de ubiquitina. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos fue realizado por Clustal W y el árbol filogenético fue construido usando MEGA X con el método Neighbor-Joining. Secuencias de aminoácidos tomadas de (Hernandez-Garcia et al., 2010).

En la actualidad, existe una serie de bases de datos que tienen información de secuencia de genes vegetales provenientes de numerosos estudios de transcriptómica. Utilizando la herramienta Soybean eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp_soybean/cgi-bin/efpWeb.cgi), se analizó *in silico* la expresión del gen *GmUbi3* (Glyma20g27950). Estos análisis mostraron que los niveles de expresión de *GmUbi3* fueron muy elevados en todos los tejidos vegetales

analizados, siendo la raíz el órgano donde se alcanzó la mayor acumulación del transcritpo ().

Tabla 12: Valores de expresión RPKM del gen GmUbi3 (Glyma20g27950) en diferentes tejidos según la base de datos “Soybean eFP Browser”.

Tejido	Nivel de expresión RPKM*
Brote de meristema apical (SAM)	1169,00
Flores	2194,17
Vainas verdes	2222,03
Hojas	2109,07
Nódulo	912,20
Raíz	3056,28
Punta de raíz	985,81

*RPKM del inglés “Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads” representan las lecturas por Kb de transcritpo, por millón de lecturas mapeadas.

En la misma base de datos, realizamos una comparación con el resto de los genes (GmUbi 1 al 10) y visualizamos que, en todos los tejidos evaluados, GmUbi 3 se expresa en mayor cantidad con respecto al resto de los genes como se muestra en la siguiente gráfica con la barra gris (Figura 12). Se observa también el mayor nivel de expresión en la raíz, vainas verdes y flores.



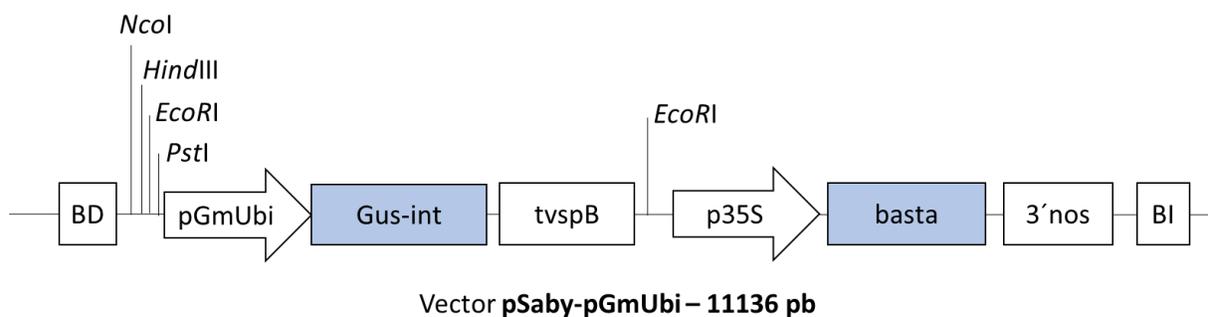
Figura 12: Gráfica comparativa de expresión, de los genes GmUbi 1 al 10, en la base de datos eFP Browser, en diferentes órganos de soja. Las flechas rojas señalan los órganos donde la señal es mayor para el gen GmUbi 3.

Estos resultados corresponden a datos de RNA-Seq obtenidos a partir de tres réplicas biológicas de distintos tejidos de soja, cultivar 'Williams 82' [154]. En base a estos datos de la literatura, se eligió una región de aproximadamente 950 pb corriente arriba de la secuencia codificante del gen de poliubiquitina de soja *GmUbi3* (Glyma20g27950), como promotor para dirigir la expresión constitutiva de genes candidatos en soja.

Para evaluar la funcionalidad del promotor *GmUbi3*, se amplificó esta secuencia a partir de ADN genómico del cultivar N7001 (ver en la sección 9.5.1) y se clonó en un vector binario, derivado del vector pUb-DEST [123] junto con el gen reportero *GUS*, que codifica para la enzima β -glucuronidasa. La actividad β -glucuronidasa no está presente en células vegetales y es fácilmente detectable mediante ensayos colorimétricos, fluorimétricos o histoquímicos. En este caso en particular, se utilizó una versión del gen *GUS*, al cual se le incorporó un intrón de un gen de ubiquitina de maíz [155], para poder garantizar que la actividad de su proteína se deba a la expresión de *GUS* a partir de las células vegetales y no provenga de una eventual expresión en *A. tumefaciens*, la bacteria utilizada como vector para la transformación de plantas.

A su vez, se incorporó a la construcción génica el terminador del gen *VspB* de soja (vacuolar storage protein B), el cual ha sido utilizado previamente en forma exitosa para regular la correcta expresión de transgenes en esta planta [156]. La región 3' no traducida de *GmVspB*, de 591 pb, fue aislada mediante amplificación por PCR a partir de ADN genómico del cultivar N7001 de soja y clonada corriente abajo del gen *GUS*. Las secuencias del promotor, terminador y la región codificante del gen *GUS* fueron ensambladas en el vector pUbi-Dest, a través de la recombinación de sus extremos usando el método de GeneArt™ Seamless Cloning.

La construcción obtenida fue denominada pSaby-GmUbi y se encuentra representada esquemáticamente en un vector lineal en la Figura 13.



Vector pSaby-pGmUbi – 11136 pb

Figura 13: Mapa del vector binario pSABY-pGmUBi construido para evaluar las regiones reguladoras de soja (promotor y terminador) en plantas modelos. Entre los bordes derecho e izquierdo insertamos dos casetes: uno de expresión (pGmUbi3 – GUS-int – tGmVspB) y el otro de selección en plantas (basta). BD: borde izquierdo que delimita la región T-DNA (ADN de transferencia) del vector binario; pGmUbi: promotor del gen de Ubiquitina 3 de soja; Gus-int: gen que codifica para la β -Glucuronidasa con un intrón de maíz; tvspB: región 3'UTR del gen que codifica para la Vegetative Storage Protein B de soja; p35S: promotor 35S del virus de mosaico del coliflor; basta: gen ppt (Fosfinotricina N-acetiltransferasa); 3'nos: secuencia 3' no traducida de nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*; BI: borde derecho del T-DNA.

Con el objetivo de evaluar la actividad del promotor *GmUbi3*, se transformó una cepa de *A. tumefaciens* con la construcción pSaby-GmUbi y se realizaron ensayos de expresión

transitoria mediante agroinfiltración de hojas de tabajo y monitoreo de la actividad β -glucuronidasa (Figura 14).

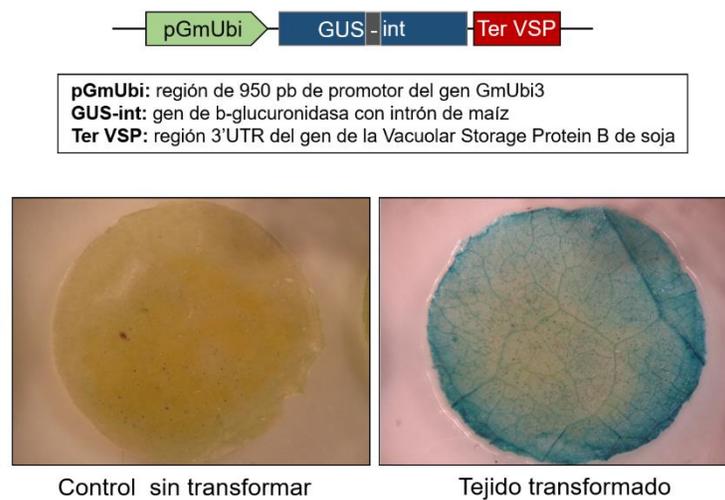


Figura 14: Expresión de β -glucuronidasa en hojas de *Nicotiana tabacum* transformadas de forma transitoria con *Agrobacterium tumefaciens*. Discos de hojas infiltradas y no infiltradas con *Agrobacterium* conteniendo un vector binario con la construcción génica esquematizada en la Figura. Los discos fueron incubados por 3 horas en una solución con el sustrato de la β -glucuronidasa, X-Gluc, y procesados para estudiar la expresión de la enzima in situ mediante ensayos histoquímicos.

Para el análisis de la actividad GUS, se obtuvieron discos de hoja a partir de las zonas agroinfiltradas y se realizaron ensayos histoquímicos 48 h después de la agroinfiltración, utilizando el sustrato X-Gluc, de acuerdo al protocolo de referencia [131]. Los resultados muestran que las hojas transformadas, en presencia del sustrato X-Gluc, desarrollan un intenso color azul, demostrando un nivel alto de expresión del gen reportero.

Estos resultados permitieron determinar que la secuencia aislada de la región del promotor *GmUbi3* regula correctamente la expresión génica del gen reportero.

10.1.2 Aislamiento de un promotor inducible por estrés hídrico

La expresión constitutiva puede presentar dificultades por varias razones. Si un transgén específico se sobreexpresa en el momento equivocado del desarrollo, en tejidos donde normalmente no se expresa, o en niveles muy altos, puede tener consecuencias inesperadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas y, potencialmente, en el medio ambiente.

Para la selección de secuencias promotoras inducibles por déficit hídrico en soja, se recurrió a resultados previos del laboratorio obtenidos a partir de la comparación del perfil transcripcional entre dos variedades contrastantes de soja (tolerante y susceptible a sequía), sometidas a déficit hídrico [157]. En esos estudios, se construyeron librerías de ADN copia sustraídas, enriquecidas en genes de soja inducidos por sequía en una variedad tolerante cv. N7001[157]. N7001 fue comparada con una variedad susceptible TJS2049 en condiciones de

estrés temprano y tardío y se identificó un grupo de genes de respuesta inducibles por deshidratación que confieren protección a la planta. Entre los genes seleccionados, se identificaron dos que codifican proteínas de la familia de las dehidrinas (Dehidrina: DHN- 13 kDa (Glyma.19G114700); Dehydrin: DHN- 27 kDa (Glyma.09G185500)[122].

Con estos dos genes inducibles por sequía como posibles candidatos, se realizó un análisis de expresión *in silico* utilizando la base de datos Soybean eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp_soybean/cgi-bin/efpWeb.cgi).

La muestra los niveles de expresión de ambas dehidrinas y refleja cómo la expresión a nivel basal de la DHN-13kDa, es mayor que la DHN-27kDa en todos los órganos medidos y en condiciones óptimas de crecimiento. Ambas dehidrinas se expresan en mayor medida en las flores.

Tabla 13: Niveles de expresión basal de los genes DHN-13kDa y DHN-27kDa en diferentes tejidos y etapas de desarrollo tomados de la base de datos Soybean eFP Browser.

	DHN- 13 kDa (Glyma.19G114700)	DHN- 27 kDa (Glyma.09G185500)
Tejidos	Nivel de expresión RPKM*	Nivel de expresión RPKM*
Brote de meristema apical (SAM)	2441.09	1.77
Flores	3262.79	14.23
Vainas verdes	2782.32	1.36
Hojas	1457.06	3.9
Nódulo	33.5	0.0
Raíz	663.52	1.84
Punta de raíz	39.86	1.23

**RPKM del inglés “Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads” representan las lecturas por Kb de transcripto, por millón de lecturas mapeadas.*

Otros estudios transcriptómicos reportados [158], [159] y [160], demostraron la inducción de estas dehidrinas en condiciones de estrés por sequía en diferentes etapas de crecimiento como se muestra en la .

Los niveles de expresión diferencial (del inglés “fold change”) para cada gen fueron determinados en condiciones de estrés por sequía con respecto a condiciones óptimas de riego. Lo primero que podemos visualizar en estos resultados consultados en la bibliografía, es que ambas proteínas se inducen frente a condiciones de déficit hídrico comparado con las condiciones óptimas de crecimiento. Por otro lado, en todos los casos, la DHN-27kDa (Glyma.09G185500) se induce en mayor medida que la DHN- 13 kDa (Glyma.19G114700).

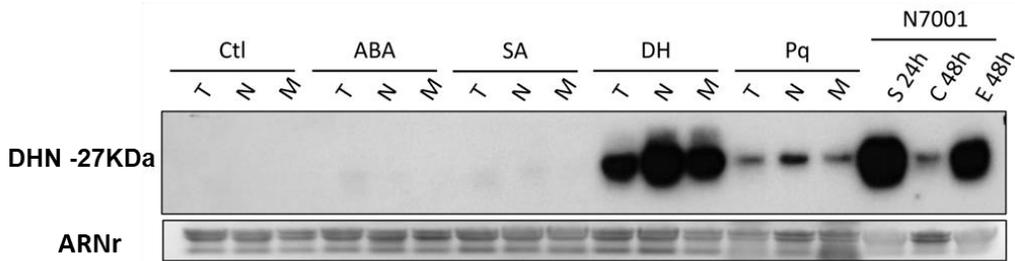
Tabla 14: Comparación de los niveles de expresión diferencial (fold change) de los genes DHN- 27 kDa (Glyma.09G185500) y DHN- 13 kDa (Glyma.19G114700) en condiciones de estrés por sequía con respecto a condiciones óptimas de riego, en tres estudios diferentes de transcriptómica de soja.

Condición de deshidratación			Genotipo de soja	ARN aislado de:	DHN- 27 kDa (Glyma.09G185500) Fold change	DHN- 13 kDa (Glyma.19G114700) Fold change	Análisis	Publicación
6 días sin riego, con SMC ("Contenido volumétrico de humedad del suelo") por debajo del 5%			Williams 82	hojas (V6)	149,09	10,34	Análisis de microarrays de hojas (V6) estresadas por la sequía, usando el 66K Affymetrix Soybean Array GeneChip.	Le, 2012
				hojas (R2)	59,39	3,69	Análisis de microarrays de hojas(R2) estresadas por la sequía, usando el 66K Affymetrix Soybean Array GeneChip.	
Deshidratación durante 8 horas/ condiciones control	D_8/CK	Heinong44	hojas V3	4,67	***	Análisis por NOISeq con el criterio de fold change ≥ 2 y $q \geq 0.8$	Wang, 2018	
Deshidratación durante 24 horas/condiciones control	D_24/CK	Heinong44		6,61	***			
Plantas colectadas en la etapa R2 de floración. Las plantas enteras, se sacaron de la maceta, se la lavaron las raíces y se expusieron al aire. Después de los intervalos de tiempo de los tratamientos se colectaron hojas para el aislamiento de ARN.	12 hrs	PI 416937 (soja tolerante de marchitamiento lento)	hojas (R2)	6,38	0,69	Las librerías fueron secuenciadas por HiSeq2000 y las diferencias de expresión entre los genotipos y los tratamientos fueron analizadas por CuffDiff	Shing, 2015	
	24 hrs			8,56	1,39			
	12 hrs	Benning (soja sensible)		6,42	0,81			
	24 hrs			-5,00	1,09			

Para estudiar el perfil de expresión génica de GmDHN-27kDa, se efectuaron ensayos de Northern blot a partir de muestras de ARN total obtenidas de 3 genotipos de soja diferentes, los cultivares N7001, TJS2049 y Munasqa, que presentan comportamientos contrastantes frente a condiciones de sequía. En particular, el genotipo N7001 es considerado tolerante frente a sequía por presentar el fenotipo de marchitamiento lento “slow wilting” [157]. La extracción del ARN total de los tres genotipos se realizó en estadio V2 (vegetativo 2: segundo trifolio expandido), tanto en hojas como en raíces y frente a distintos tratamientos como se muestra en la Figura 15. A su vez, se extrajo ARN a partir de semillas (S), cotiledones (C) y embriones (E) del genotipo N7001.

Entre los tratamientos realizados, se incluyó el agregado de las hormonas ácido salicílico (SA) y ABA, para determinar una posible regulación en distintas condiciones de estrés biótico y abiótico, respectivamente. A su vez, las plantas fueron tratadas con paraquat (Pq - metilviológeno), un herbicida que induce la producción del radical superóxido a nivel de los cloroplastos, como condición de estrés oxidativo. Así mismo, las plantas fueron sometidas a un estrés por deshidratación mediante la interrupción del riego hasta llegar a una capacidad hídrica del sustrato del 50%.

Expresión en hojas



Expresión en raíces

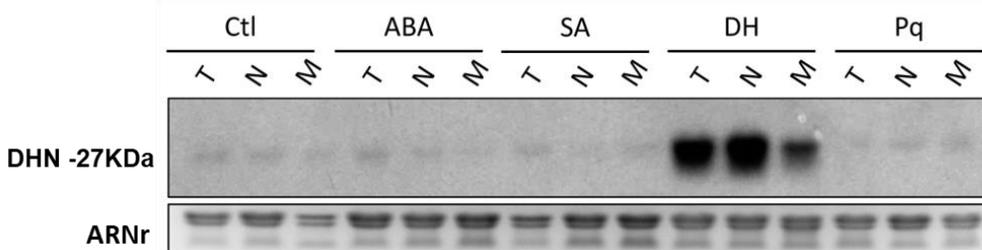


Figura 15: Perfil de expresión del gen de dehidrina de 27 kDa por Northern blot en variedades de soja contrastantes. Genotipos: T (TJS2049); N (N7001); M (Munasqa). Tratamientos: 24 h a menos que se indique lo contrario. Ctl: control; ABA 2 μ M; SA 2 mM; DH: deshidratación 3 días; Pq: 1 μ M. S: semillas; C: cotiledones; E: embriones. Control de carga de ARN en gel de electroforesis: tinción de muestras con bromuro de etidio (ARNr). En el Northern superior se evaluó la expresión del gen en hojas, en las diferentes condiciones y genotipos. Además se agregó en el gel, el ARN de la variedad de soja N7001 extraído de semillas, cotiledones y embriones para evaluar su expresión. En el Northern inferior se evaluó la expresión del gen DHN en raíces en las diferentes condiciones y genotipos.

Como se puede observar en la Figura 15, GmDHN se induce fuertemente en condiciones de deshidratación tanto en hojas como en raíces. La evaluación del estrés oxidativo provocado por el agregado de Pq demostró la expresión en hojas y no en raíces en los tres genotipos. En los tejidos deshidratados naturalmente en el grano de soja (cultivar N7001) se demostró también la expresión de la dehidrina, donde se induce en mayor medida en el embrión que en los cotiledones.

Este claro perfil de expresión en condiciones inducibles por sequía nos permitió elegir el gen *GmDHN* (Glyma.09G185500) para clonar su región promotora en el sistema de vectores desarrollados en este trabajo y de esta forma poder contar con un sistema de expresión inducible, de genes asociados a la tolerancia al estrés hídrico.

Muchos genes inducibles por estrés abiótico contienen dos elementos *cis* dentro de sus promotores. Estos son un elemento de respuesta a la deshidratación o DRE (TACCGACAT) [161], y un elemento de respuesta a ABA o ABRE (ACGTGG/TC) [162]. A estas secuencias se unen TFs como vías de respuesta, dependientes e independientes de ABA cuando las plantas detectan señales de estrés (salinidad, sequía, frío, etc.) (Figura 16).

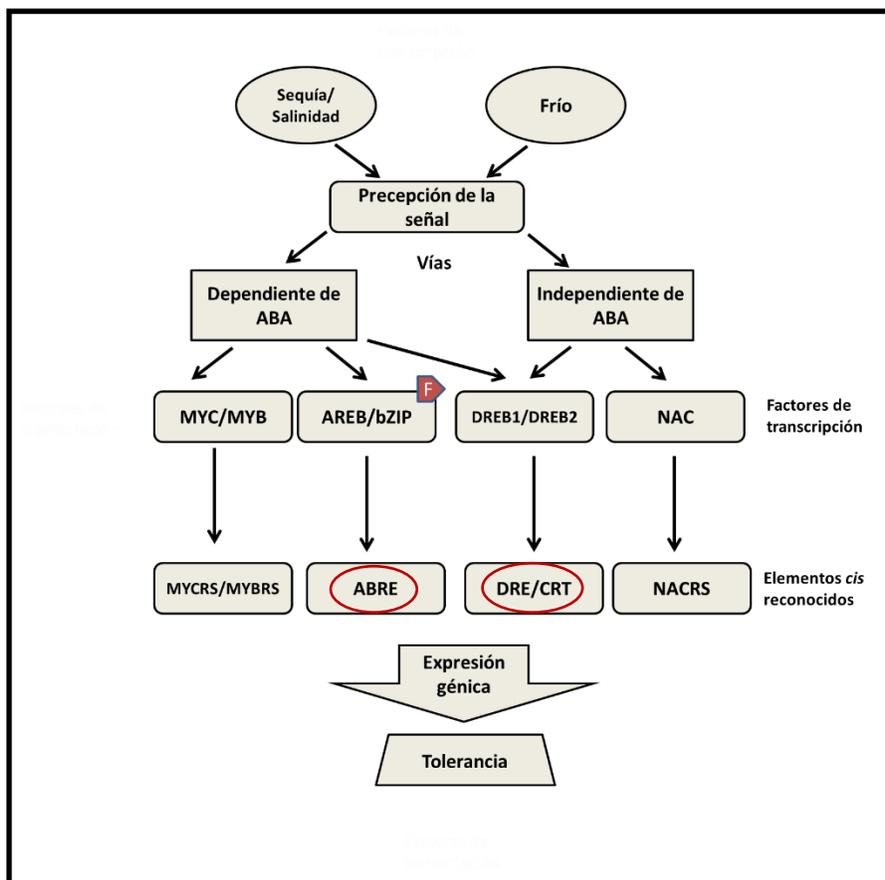


Figura 16: Representación esquemática de las vías de regulación transcripcional involucradas en las respuestas a estrés abiótico, dependiente e independientes del ABA. Se muestran los elementos *cis* y las familias de factores de transcripción que conforman las diferentes vías. Tomado de Gallino, 2013 [122].

Para identificar posibles elementos en *cis* presentes en el promotor pGmDHN, realizamos un análisis *in silico* de la secuencia del promotor usando la base de datos PlantCare [163]. Como resultado, se identificaron varios elementos *cis* dependiente de ABA (ABRE) en la secuencia del promotor, involucrado en la capacidad de respuesta al ácido abscísico (Figura 17Figura 17A). Este análisis nos permite clasificar el gen DHN seleccionado como dependiente de ABA frente a condiciones de estrés por sequía, a pesar de no observar expresión del gen frente al tratamiento con esta hormona (Figura 15). En la Figura 17B, se listan otros elementos reguladores identificados en el promotor que arroja la base de datos PlantCare.

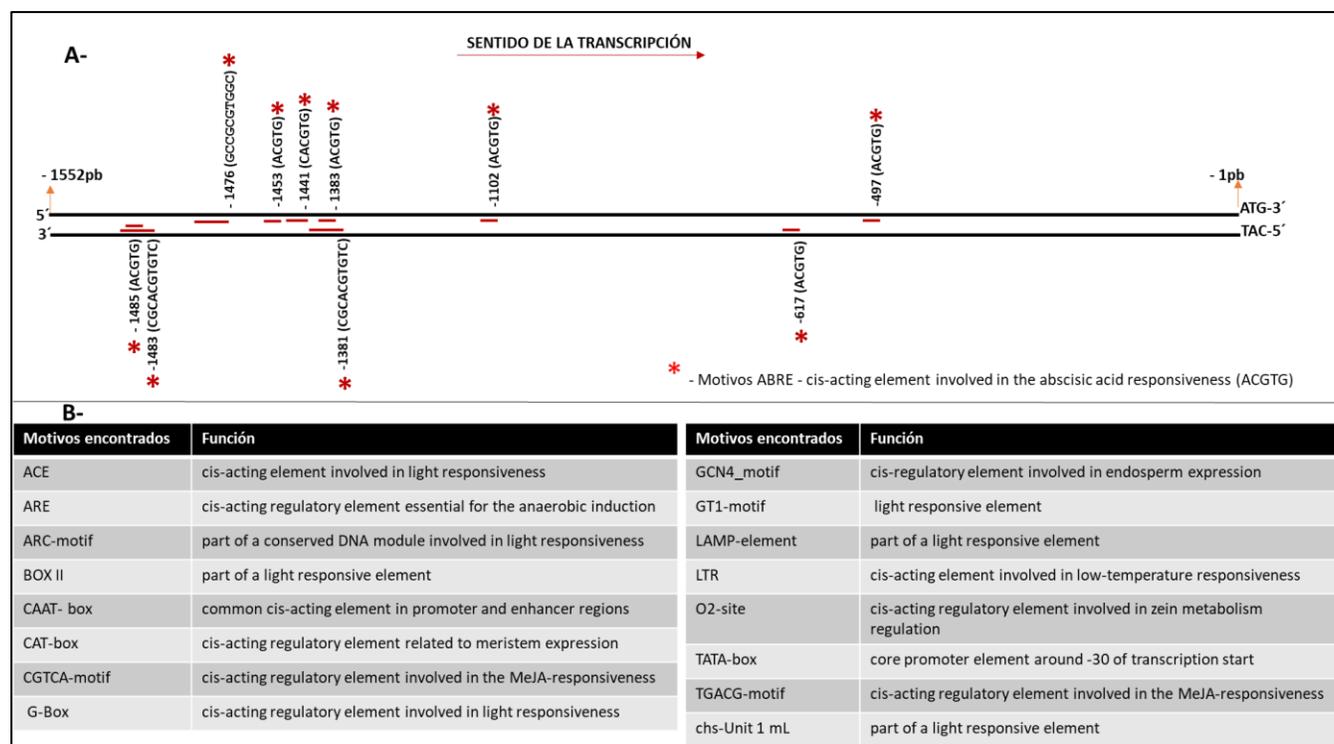


Figura 17: Análisis de elementos *cis* en la secuencia del promotor pGmDHN (1552pb) a través de la base de datos "PlantCARE". **A:** Representación esquemática de la región promotora y ubicación de las secuencias ABRE identificadas corrientes arriba en las posiciones con los pb negativos. **B:** Listados de otros motivos identificados en la secuencia y sus funciones.

La secuencia genómica correspondiente al gen *GmDHN* la obtuvimos a partir de la base de datos Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), en el genoma de referencia de soja (*Glycine max* Wm82.a2.v1). Para amplificar una secuencia lo suficientemente extensa como para contener todos los elementos necesarios para la regulación del gen pGmDHN, se seleccionaron 1414 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción (ATG) y se diseñaron cebadores para amplificar esta región a partir del ADN genómico de la variedad de soja N7001. Los cebadores incluyeron la inserción de los sitios de restricción *NotI/KpnI* en el promotor (*NotI*-pGmDHN-*KpnI*) para su posterior clonación en el vector de destino.

10.2 Componentes y ensamblado de vectores para transformación génica

Dado que en el transcurso de este trabajo se optó por utilizar el método de transformación de soja basado en biolística, en las siguientes construcciones génicas se sustituyó el casete de resistencia al herbicida Basta, por un módulo de resistencia a higromicina como agente de selección de las células transformadas. El motivo de este cambio de estrategia fue la mayor eficiencia de transformación que observamos con el método de biolística en comparación con el método de transformación mediada por *A. tumefaciens*, y el hecho de que la selección mediada por Basta no es efectiva en el tipo de explantes que se utilizan en biolística (embriones somáticos). Tomando en cuenta estos antecedentes, se generó un nuevo vector de transformación conteniendo el sistema Cre/loxP y el módulo de expresión de la higromicina fosfotransferasa para conferir resistencia a ese antibiótico.

El sistema de vectores de transformación de soja fue diseñado para la modificación genética de esta especie mediante métodos biológicos y físicos. En cuanto al método físico elegido (biolística), una característica importante a tener en cuenta es la posibilidad de minimizar el tamaño del vector para reducir la probabilidad de fragmentación del ADN con el impacto de las partículas en el tejido vegetal. Teniendo en cuenta este aspecto se partió del plásmido pBluescript SK(-); acc. X52324.1, al cual se le eliminó la secuencia comprendida entre los sitios de restricción *NaeI* y *KpnI*, conteniendo gran parte del origen de replicación del fago f1 (*f1 ori*) y el promotor T7, como se muestra en Materiales y Métodos, sección 9.8 y Figura 7.

Con la región seleccionada del vector pBluescript SK(-), diseñamos un vector base y sintético que identificamos como pSBio (4855 pb), cuyo mapa circular se muestra en la Figura 18 - I), en la cual hacia la región 3' del sitio *NaeI* de la base del vector pBSK(-), agregamos en el siguiente orden un **Sitio de Múltiple Clonado** (SMC) con las regiones (*SrfI*, *NotI*, *KpnI*, *XhoI*, *AscI*), seguido del terminador de soja TVspB, la secuencia *loxP1*, otro SMC (*AfeI*, *SpeI*, *PacI*), casete de regulación de la Cre recombinasa tomado del vector pX6-GFP y a continuación el sitio *loxP2*. A partir de este vector pSBio, clonamos por restricción las regiones de interés que podemos identificar en la Figura 18 -II) dentro de los casetes de expresión (A), de regulación (B), de selección en plantas (C) y de recombinación (D). El resultado final y orden de todas las secuencias se observa en los mapas lineales del vector de biolística de la Figura 18- III), donde sólo cambia el promotor de soja pGmUbi o pGmDhn.

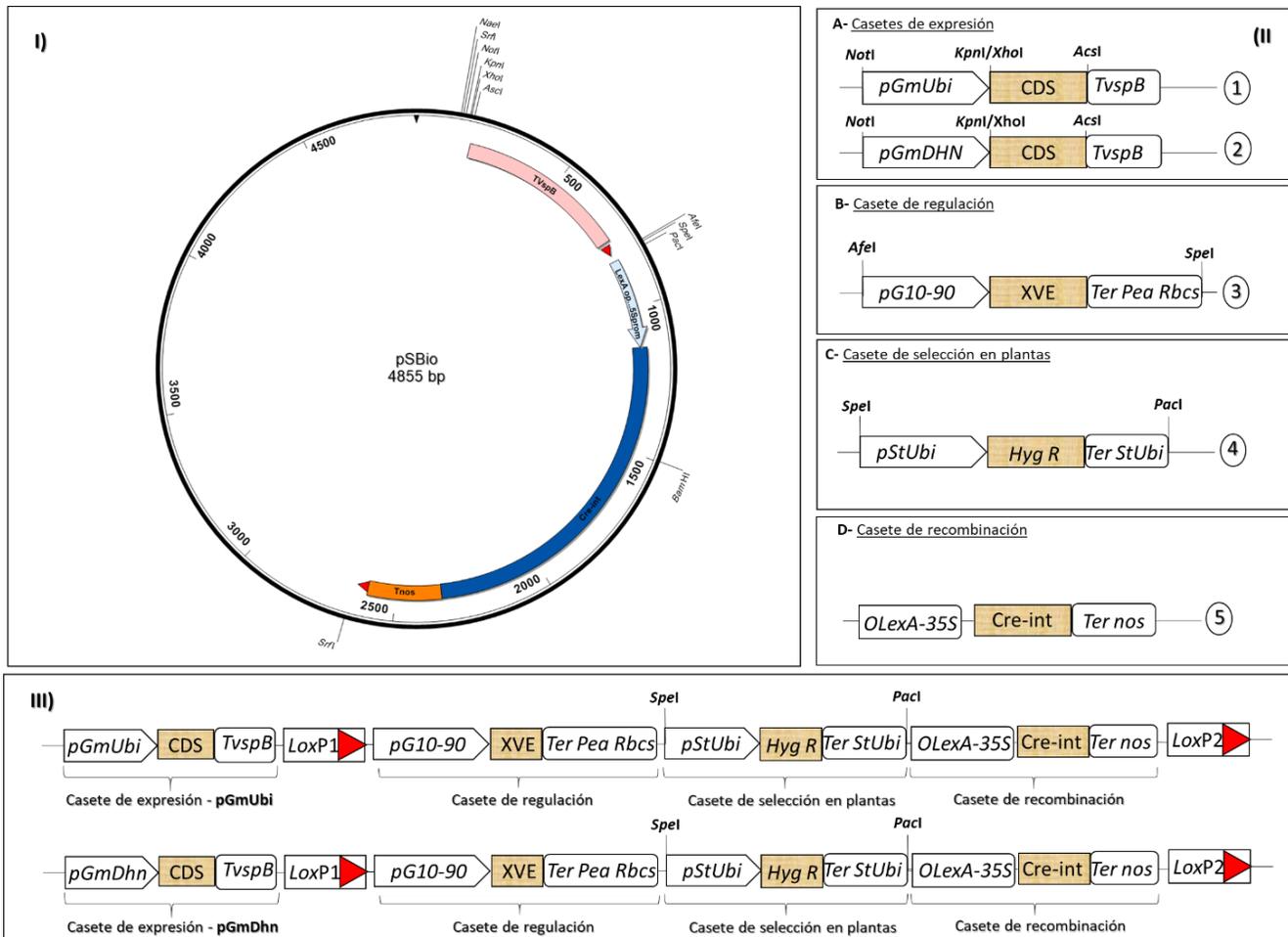


Figura 18: Esquema de los vectores para la transformación genética de plantas por biolística. **I)** Mapa del vector base pSBio circular: vector que se sintetizó incluyendo un fragmento del vector pBluescript SK(-) como backbone; la secuencia TVspB: Terminador gen Vegetative Storage Protein B de soja; loxP1: sitio de recombinación de la Cre recombinasa; el casete de recombinación (también representado en la parte II)-5 y III) que incluye la región OLexA-35S: operador LexA (8 copias de la secuencia) fusionado a la secuencia del promotor mínimo(-46) 35S de CaMV, fusionado a la Cre-int: cre recombinasa conteniendo el intrón V del gen KOR1 de Arabidopsis, seguido del Ter nos: terminador de la nopalina sintasa de Agrobacterium tumefaciens. A este casete le prosigue sitio de LoxP2: sitio de recombinación de la Cre recombinasa. **II)** Representación de los casetes de expresión incluidos en los vectores de biolística: casetes de expresión: **1)** pGmUbi-CDS-TVspB: pGmUbi: promotor poliubiquitina de soja, CDS: región codificante de cualquier gen que sea necesario insertar en la planta de forma estable. Nosotros usamos los genes reporteros fusionados eGFP:GUS y unidos al terminador TvspB descrito en I) y **2)** pGmDhn-CDS-TVspB con el pGmDHN: promotor dehidrina de soja; **3)** casete de regulación: pG10-90-XVE-Ter Pea Rbcs: con pG10-90 : promotor sintético G10-90, XVE: fusión gene: activador transcripcional quimérico constituido por el dominio de unión al ADN del represor bacteriano LexA, el dominio ácido de transactivación de VP16, y la región carboxilo terminal del represor de estrógenos humano, Ter Pea Rbcs: Terminador del gen Rbcs3A del poroto; **4)** casete de selección en plantas: pStUbi-HygR-Ter StUbi: con pStUbi: promotor de Ubi3 de Solanum tuberosum, Hph: hygromycin B phosphotransferase (resistencia a higromicina), StUbi3 ter: terminador del gen Ubi3 de Solanum tuberosum; **5)** Casete de recombinación: OLexA 35S-Cre int- Ter nos (partes definidas en I)). **III)** vectores de biolística lineales luego de la clonación de todos los casetes identificados en II), que se diferencian sólo en el promotor de soja GmUbi o pGmDhn contenido en el casete de expresión. Entre los sitios loxP, quedan incluidos los casetes de regulación, selección y recombinación, con el objetivo de ser eliminados luego obtener las plantas de soja transgénicas y estables.

10.3 Sistema Cre/LoxP para eliminar las secuencias no deseadas del genoma

El vector de transformación contiene el gen *cre* bajo el control de un promotor inducible por β -estradiol, un compuesto ausente en el tejido vegetal. De esta forma, es posible mantener un estricto control sobre la expresión de esta proteína y poder regular el momento de escisión del ADN no deseado. El sistema de expresión inducible consistió en la secuencia mínima del promotor sintético G₁₀₋₉₀ [164], controlando la expresión de la proteína XVE. Esta última es un activador quimérico de la transcripción, constituido por la región que codifica el dominio de unión al ADN del represor bacteriano LexA, el dominio ácido de transactivación de VP16, y la región carboxilo terminal del represor de estrógenos humano. Como región de terminación de la transcripción del gen XVE, se utilizó la secuencia 3'UTR del gen *Rbcs3A* de poroto. Este módulo de expresión de 2180 pb fue amplificado por PCR a partir del vector pER 8 [116], aportado por el Prof. N-H Chua de Rockefeller University. La amplificación se realizó con los cebadores FW Afe-G10b (20) y RV_Spe_Ter Pcr b (21), insertando con estos las regiones 5'-*AfeI* y 3'-*SpeI*, sitios en los cuales se insertó en el pSBio luego de digerirlo también con estas enzimas.

Un segundo módulo de expresión consistió en el gen *cre-int*, el cual codifica para la cre recombinasa, conteniendo el intrón V del gen *KORI* de *Arabidopsis* [165]. La presencia del intrón permite asegurar que la producción de la proteína cre ocurra en células vegetales, evitando su acumulación en células bacterianas lo cual podría interferir con el proceso de clonación y transformación. Para regular la expresión de *cre*, se clonó una secuencia correspondiente al operador LexA (en ocho copias), sucedidas por el promotor mínimo (-46) 35S de CaMV [116] y el terminador 3' nos, proveniente del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*. Este sistema permite que ante el agregado de β -estradiol, el represor XVE se libere del operador LexA y consecuentemente se induzca la expresión del gen *cre-int*. Como describimos anteriormente, este módulo quedó incluido en el vector pSBio que se envió a sintetizar. Una vez inducida la enzima Cre recombinasa, esta escindirá en el genoma las regiones comprendidas entre los sitios *LoxP* debido a que estos se encuentran orientado en el mismo sentido en el vector pSBio.

10.3.1 Módulo de selección de células transformadas (módulo 4)

Para facilitar la selección de los eventos transformados, se incorporó al vector un módulo de expresión conteniendo el promotor del gen de ubiquitina de *Solanum tuberosum* *StUbi3* [166], el gen *hph* (hygromycin B phosphotransferase) y la región 3'UTR del gen *StUbi3*. La expresión de *hph* confiere a la planta resistencia a higromicina. Este último módulo de expresión fue aislado del vector pUHN4 aportado por el Dr. Parrott de University of Georgia (ver mapa del vector en la sección 13.8). Para clonarlo se realizó una digestión con las enzimas *SpeI*-*PacI* de este vector para extraer el fragmento (promotor *StUbi3*: *hph*: terminador *StUbi3*) y clonarlo en pSBio digerido en estos mismos sitios.

Se optó por este sistema de selección debido a que la higromicina es un buen agente de selección tanto en embriones somáticos como en callos.

10.3.2 Delimitación de la secuencia a escindir post-transformación (módulo 2 y 3)

Los dos sitios *LoxP* (*LoxP1* y *LoxP2*) se ubicaron en el vector sintético flanqueando los dos módulos de expresión de *cre-int* y el módulo de selección. De esa manera, una vez seleccionadas las plantas transgénicas, estas secuencias pueden ser eliminadas del genoma ante el agregado de β -estradiol como se representa esquemáticamente en la Figura 19.

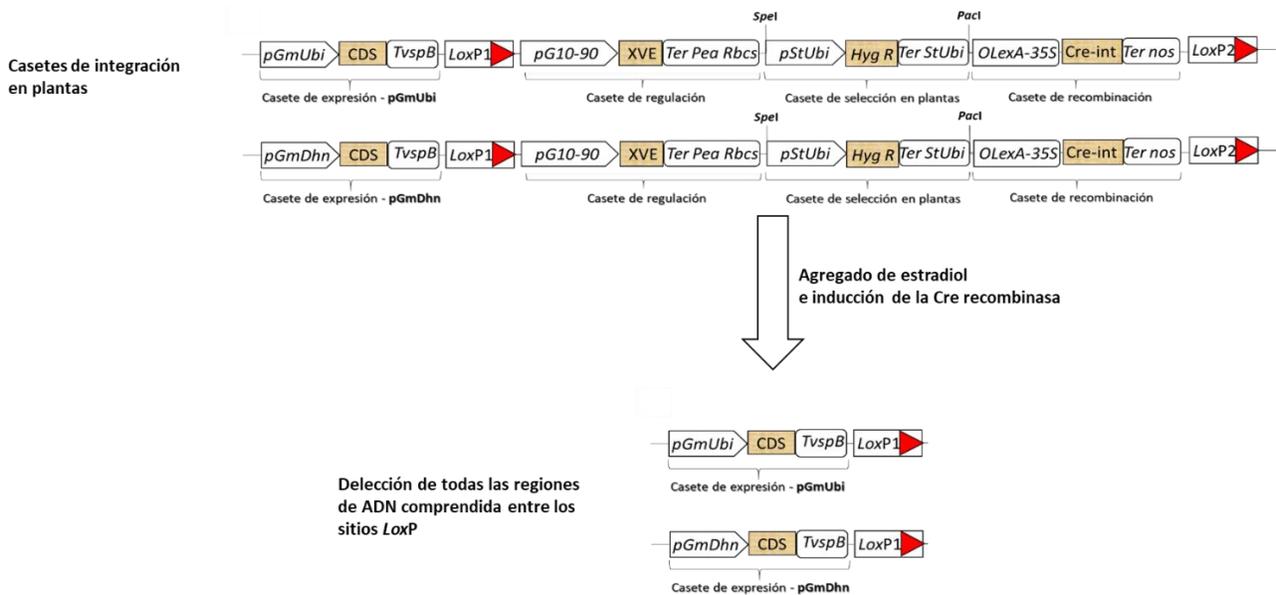


Figura 19: Representación esquemática de las secuencias resultantes luego de inducir el sistema *Cre/loxP* en plantas transformadas de forma estable con estos vectores. Toda la región comprendida entre los sitios *loxP* será deletionada debido a que se encuentran las regiones *loxP* orientada en el mismo sentido en la misma secuencia de ADN.

Para facilitar el clonado de los módulos de expresión de los genes candidatos, se introdujo una secuencia con sitios de restricción únicos, en una región inmediatamente corriente arriba del sitio *LoxP1*. Esto permite el clonado de tres o más secuencias de ADN, correspondiente a promotor, región codificante y terminador.

Finalmente, para facilitar el aislamiento de la construcción entera, se generaron dos sitios de restricción para la enzima *SrfI*, flanqueando los cuatro módulos de expresión. Esta enzima es de corte poco frecuente y deja extremos romos en el ADN. De esta manera, con una única enzima se puede separar la construcción entera, permitiendo su clonado en un vector binario, o su utilización directa en la transformación vegetal en forma de ADN lineal.

Los vectores resultantes para biolística se denominaron pSBIO – *pGmUbi* y pSBIO- *pGmDhn* y se esquematizan de forma lineal en la Figura 18 III).

10.4 Construcción y evaluación de vectores pSBio-pGmUbi y pSBio-pGmDhn

Para monitorear la eficacia de las regiones reguladoras seleccionadas, una vez generado el vector base se introdujeron en estos dos tipos de módulos de expresión de genes candidatos, en ambos casos utilizando la secuencia codificante de un gen reportero quimérico, resultante de la fusión de *GFP* (enhanced Green Fluorescent Protein) con *GUS* (*eGFP-GUS*). Este gen se clonó bajo la regulación del promotor GmUbi, para generar el vector pSBio-GmUbi, o bajo la regulación del promotor inducible por sequía GmDHN, para generar el vector pSBio-GmDHN. De esta manera, la actividad de los promotores fue monitoreada mediante visualización de la fluorescencia emitida por GFP, o mediante la detección de la actividad β -glucuronidasa en la cual se forma un producto de color azul en los tejidos que expresan este gen reportero.

Para ello, la secuencia correspondiente al promotor **pGmUbi** se amplificó a partir del vector pSABY-pGmUbi, utilizando los cebadores FW-NotGmUbi-2 (23) y RV-Kpn GmUbi (24).

En segundo lugar, el promotor inducible **pGmDHN** se amplificó con los cebadores FW-NotGmDHN-1 (25) y RV-KPNGmDHN (27) a partir de ADN genómico de soja variedad N7001, para insertar los mismos sitios *NotI* y *KpnI*.

Los genes reporteros fusionados *eGFP-GUS* con un tamaño de 2900 pb, fueron amplificados a partir del vector pBGWFS 7.0 (Karimi, Inzé, & Depicker, 2002) con los cebadores GFP *XhoI*-fw y GFP *Ascl*-rv para insertar los sitios *XhoI*-*eGFP-gus*-*Ascl*. Todos los fragmentos fueron clonados mediante restricción y ligación.

10.4.1 Evaluación de vectores pSBio-pGmUbi y pSBio-pGmDhn

Con el objetivo de evaluar experimentalmente la actividad de los promotores aislados para controlar la expresión de genes candidatos, se clonaron los genes reporteros fusionados *eGFP-GUS* bajo el control del promotor GmUbi o del promotor GmDHN.

Las construcciones resultantes, pGmUbi-GFP:GUS o pGmDHN-GFP:GUS, fueron introducidas por biolística en células de hojas de soja o de puerro o en embriones somáticos de soja.

Luego de la transformación, los tejidos bombardeados fueron observados en un estereoscopio de fluorescencia para visualizar la señal de GFP o incubados por 3 h en una solución con el sustrato de la β -glucuronidasa, X-Gluc, y procesados para estudiar la expresión de esta enzima *in situ*, mediante ensayos histoquímicos (Figura 20). El bombardeo de hojas de soja se realizó de acuerdo con el protocolo desarrollado por Dou y colaboradores en el 2008 [167], utilizándose las primeras hojas verdaderas (monofoliadas), obtenidas de 9 a 14 d después de la siembra.

Los resultados muestran que el promotor *GmUbi* promovió la expresión de GFP:GUS en todos los tejidos ensayados, como son las hojas de puerro y hojas y embriones de soja (Figura 20A), mientras que el promotor *GmDHN* lo hizo únicamente en embriones somáticos (Figura 20B). Esto es coherente con los perfiles de expresión génica de estos genes, que indican que *GmUbi* tiene una expresión basal y constitutiva, mientras que *GmDHN*, en condiciones óptimas de crecimiento, sólo se expresa en embriones u otros componentes de la semilla. Por el contrario, este gen se expresa fuertemente en respuesta al estrés hídrico en hojas, siendo este factor de estrés, difícil de reproducir en tejidos transformados en forma transitoria. Para analizar la actividad del promotor *GmDHN* en hojas de puerro en respuesta a estrés, se analizó la expresión del gen reportero frente a temperaturas bajas (4 °C), por ser un factor de estrés que frecuentemente puede inducir la expresión de genes de dehidrinas en plantas.

Las hojas bombardeadas mostraron una clara inducción de la señal de GFP, indicando que la secuencia del promotor aislada contiene los elementos necesarios para controlar correctamente la expresión génica frente a condiciones de estrés o en el desarrollo.

Por otro lado, en el transcurso de este proyecto se realizaron las primeras etapas de transformación de embriones somáticos de soja, obteniéndose un número elevado de embriones transformados con cada una de las construcciones (Figura 21). Estos embriones están actualmente en la etapa de diferenciación para generar plántulas transformadas de la generación T0 de cada una de estas construcciones.

La actividad del gen reportero fue monitoreada mediante ensayo histoquímico utilizando el sustrato X-Gluc de GUS. Como era de esperarse, ambos promotores indujeron la expresión del transgén en este tejido.

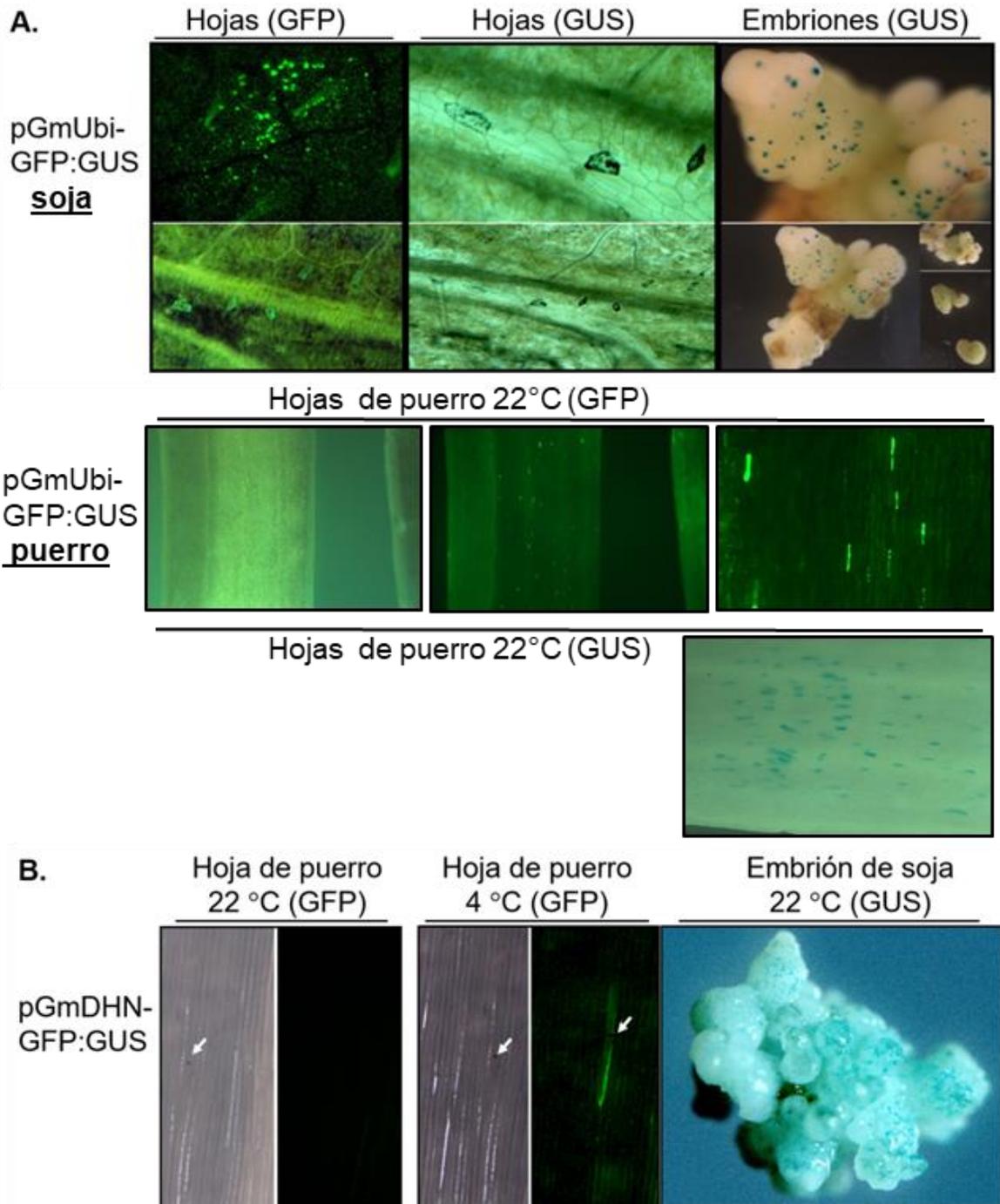


Figura 20: Expresión transitoria en hojas de puerro y en hojas o embriones somáticos de soja transformados por biolística. A. Expresión transitoria de GmUbi-GUS:GFP-TerVspB en hojas y embriones de soja y en hojas de puerro, transformados por biolística. Evaluación de actividad GFP-GUS mediante monitoreo de fluorescencia de GFP o actividad GUS mediante reacción con X-Gluc. Las fotos fueron tomadas 24 h luego del bombardeo. B. Expresión transitoria de GmDHN-GUS:GFP-TerVspB en epidermis de puerro y en embriones de soja transformados por biolística. La fluorescencia emitida por GFP fue evaluada en epidermis de puerro incubados a temperatura ambiente o a 4 °C durante dos días. A la izquierda se muestra en campo claro, a la derecha, la fluorescencia de GFP. La actividad GUS fue evaluada en embriones somáticos de soja (cultivar Jack) mediante ensayos histoquímicos con el sustrato X-Gluc. Las fotografías fueron tomadas 24 h luego del bombardeo.

Se cortaron pequeñas porciones de embriones somáticos transformados con pGmUbi-GFP:GUS (arriba) y pGmDHN-GFP:GUS (abajo) para evaluar la actividad de la β -glucuronidasa mediante el ensayo histoquímico con el sustrato X-Gluc. Los embriones fueron previamente seleccionados durante 6 semanas en presencia de higromicina antes de ser analizados.

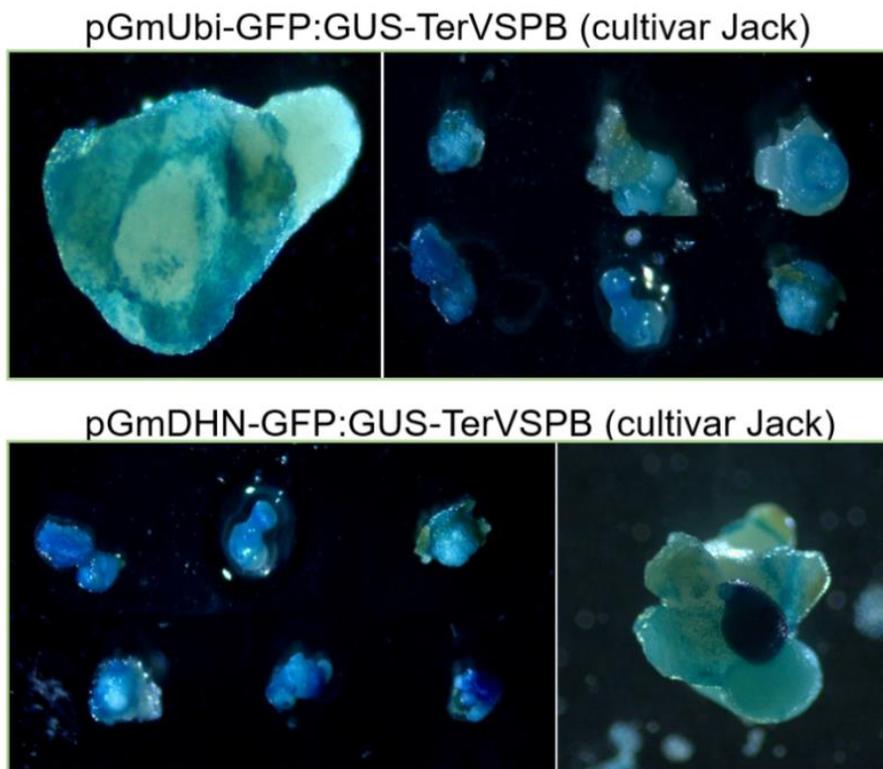


Figura 21: Transformación estable de embriones de soja con los vectores para biolística. Las imágenes superiores corresponden a la transformación del pSBio-pGmUbi que contiene el casete pGmUbi-GFP:GUS-TerVspB. Las imágenes inferiores corresponden a las transformaciones con el pSBio-pGmDhn que contiene el casete pGmDhn-GFP:GUS-TerVspB.

En cuanto al vector pSbio-pGmUbi, hemos obtenido embriones transgénicos estables del cultivar Jack de soja por biolística con el pSBio-pGmUbi-GFP:GUS. En la Figura 22 se pueden observar embriones de soja de color azul producto de la expresión del gen *GUS* detectado por el ensayo histoquímico con X-gluc. En las imágenes A y C se observan embriones en estadio de torpedo y en la B embriones en estadio globular. Una vez obtenidas las plantas transgénicas, de la generación T1, se espera evaluar la funcionalidad del mecanismo de escisión de secuencias no deseadas basado en el sistema de recombinación Cre/loxP, utilizando β -estradiol para la inducción de la expresión de la Cre recombinasa.

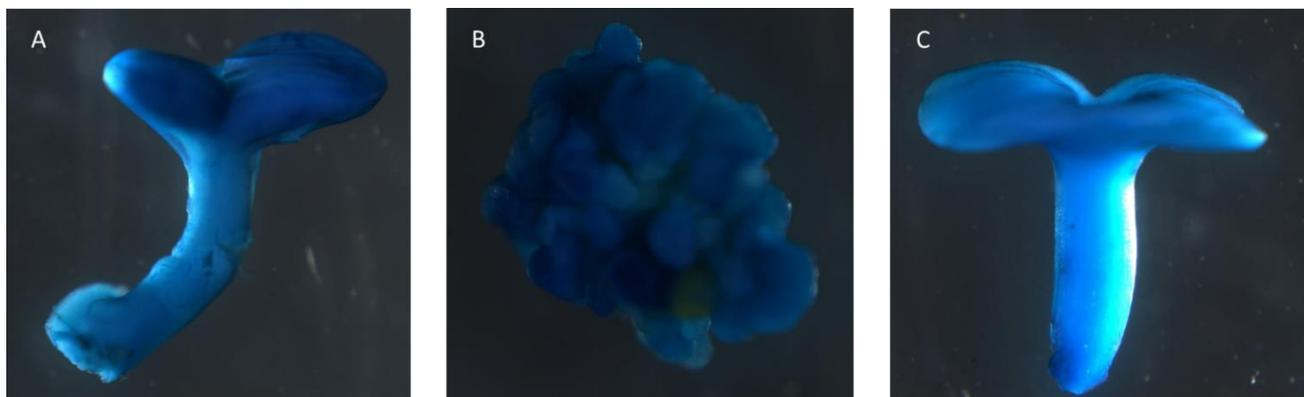


Figura 22: Embriones diferenciados de soja cultivar Jack transformados de forma estable con el vector pSBio-pGmUbi. La coloración azul observada fue desarrollada por el ensayo histoquímico con el sustrato X-Gluc debido a la expresión de la enzima β -glucuronidasa por el gen reportero GUS. A y C: embriones en estadio de torpedo. B: embriones en estadio globular.

Como resultado final, se obtuvo un sistema de vectores para biolística que permite la expresión de genes candidatos en forma constitutiva o inducible por déficit hídrico, bajo el control de secuencias reguladoras propias de soja. Este sistema permitirá la posterior escisión de las secuencias de ADN que no se desean mantener en la planta luego de la transformación. Cabe destacar que la transformación mediada por biolística permite utilizar ADN lineal. De esta manera, es posible utilizar únicamente la construcción génica generada en ausencia de la secuencia del vector. Es esperable que este sistema permita obtener plantas intragénicas con expresión modulada de genes candidatos, carentes de secuencias exógenas a esta especie vegetal.

10.5 Generación de vectores para transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Si bien la biolística representa un método eficiente para transformar la soja, la transformación mediada por *A. tumefaciens* tiene algunas ventajas con respecto a esta técnica, y puede ser el método de elección en algunos casos. La utilización de *Agrobacterium* requiere del clonado de las construcciones génicas en un vector binario, que consiste en un plásmido con un origen de replicación para *Agrobacterium* y uno para *E. coli*. A su vez, es necesario incluir las secuencias RB y al LB del ADN de transferencia (T-DNA), flanqueando la región de ADN que será transferida a la planta.

En esta Tesis se generó un sistema de vectores para transformación mediada por *Agrobacterium* compatible con los vectores para biolística. Para ello, en primer lugar, se eliminó toda la secuencia de ADN comprendida entre los RB y LB del T-DNA del vector pUB-DEST [123]. En el lugar del T-DNA, se introdujo un sitio de restricción para la enzima *AfeI*. La digestión del vector con esta enzima genera una única molécula de ADN con extremos romos (Figura 23). Este procedimiento se realizó mediante amplificación por PCR con los cebadores Scaff-fwAfeI (1006) y Scaff-rvAfeI (1007) para insertar el sitio único con extremos romos (*AfeI*) entre los RB y LB.

De esta manera, la construcción entera pudo ser escindida de pSBio mediante el corte con *SrfI*, y el fragmento correspondiente clonado en el sitio *AfeI* del vector binario.

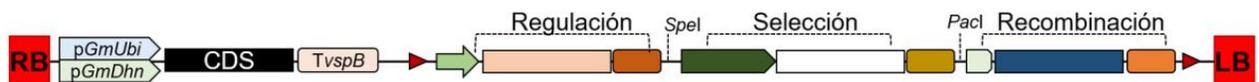
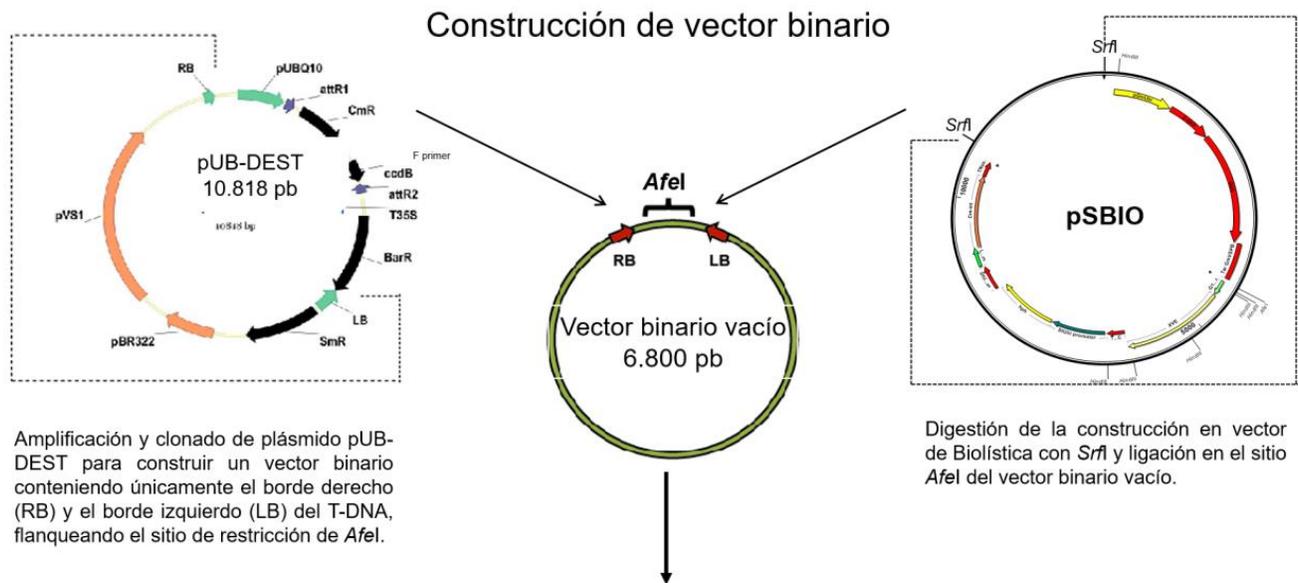


Figura 23: Representación esquemática de la estrategia seguida para generar los vectores para transformación de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. RB (right border); LB (left border); pGmUbi (promotor de *GmUbi*); pGmDHN (promotor de *GmDHN*); CDC (region codificante de gen candidato); TvspB (terminador del gen Vsp-B); Regulación (módulo de expresión de XVE); Selección (módulo de expresión de *hph*); Recombinación: módulo de expresión de *cre*.

Se obtuvo un sistema de vectores para biolística y para transformación mediada por *A. tumefaciens*, que permite el fácil intercambio de construcciones génicas entre cada tipo de vector. Estos vectores serán utilizados para clonar un conjunto de genes candidatos para su expresión constitutiva o inducible en soja.

De los dos vectores de transformación por *A. tumefaciens* diseñados, pBin-pGmUbi y pBin-pGmDhn, obtuvimos el binario con el promotor constitutivo.

10.6 Otras aplicaciones de estos vectores de transformación de soja

Además de ser de gran utilidad para la producción de plantas intragénicas, estos vectores constituyen una herramienta muy valiosa para la implementación de estrategias de ingeniería genética de precisión, como las de edición genómica. Estas técnicas frecuentemente utilizan la transgénesis como forma de introducir el sistema de modificación genética (CRISPR/Cas9) a las células vegetales [168]. La utilización de vectores de ADN para la expresión *in vivo* del sistema CRISPR/Cas9 tiene varias ventajas técnicas con respecto a otras estrategias. Entre otras, la transgénesis habilita la utilización de marcadores de selección de las células transformadas, lo cual facilita notoriamente el proceso de obtención e identificación de

mutantes. Sin embargo, para que el genotipo vegetal editado no sea considerado transgénico, una vez generadas las mutaciones buscadas, es necesario emplear estrategias para eliminar el ADN transgénico. El uso del sistema Cre/loxP representa una alternativa válida para lograr este propósito. Para ello, los componentes del sistema CRISPR/Cas9 podrán ser clonados en estos vectores de transformación entre los sitios *LoxP*. De esta manera, la inducción de la síntesis de la cre recombinasa resultará en la eliminación de los transgenes una vez generada la mutación específica. Por consiguiente, los vectores generados en este trabajo podrán ser utilizados para realizar modificaciones genéticas de precisión mediante edición genómica.

11 Conclusiones

- 1- Las secuencias inducibles por sequía seleccionadas para evaluar sus niveles de expresión fueron los genes de la familia de Dehidrinas: DHN- 13 kDa (Glyma.19G114700) y DHN- 27 kDa (Glyma.09G185500).
- 2- A nivel basal el DHN- 13 kDa se expresa más que el DHN- 27 kDa pero en condiciones de estrés por deshidratación se induce más el DHN- 27 kDa, razón por la cual fue elegido para estudiar su expresión.
- 3- El estudio del perfil de expresión, por Northern blot, corroboró que el gen de dehidrina DHN-27kDa se induce por deshidratación en hojas y raíces y por estrés oxidativo en hojas en los tres genotipos de soja evaluados.
- 4- El DHN-27kDa en el genotipo tolerante a sequía (N7001) se expresa en semillas, embriones y en menor medida en cotiledones.
- 5- Generamos tres vectores de los cuatro propuestos inicialmente, dos de ellos para la transformación de soja por biolística que se diferencian en las secuencias promotoras de soja (pGmUbi o pGmDhn) y un vector binario con el promotor constitutivo (pGmUbi).
- 6- Las regiones promotoras pGmUbi y pGmDHN regulan funcionalmente la expresión de los genes reporteros, *GFP* y *GUS* (fusionados) de forma transitoria en soja y puerro.
- 7- La región promotora pGmUbi regula adecuadamente la expresión de *GUS* en soja, integrada de forma estable en embriones.

12 Perspectivas

Este sistema de vectores tendrá la finalidad de:

- Demostrar que funciona adecuadamente el sistema de recombinación sitio específica Cre/*loxP* para eliminar los genes de selección en plantas y demás secuencias que no son endógenas de la soja, comprendida entre los sitios *loxP*.
- Clonar genes de respuesta a sequía de soja y aumentar su expresión en la misma en condiciones de sequía.
- Usarlo combinado con la tecnología de edición genómica integrando las secuencias del sistema CRISPR entre los sitios *loxP* para eliminar las secuencias no deseadas.

13 Anexos

13.1 Medio de cultivo: Murashige-Skoog (MS) (1 L)

MS mezcla basal de sales 4.31 g

MES 0.5 g

Agua ultrapura 0.8 L

Ajustar pH a 5.7 con 1M KOH

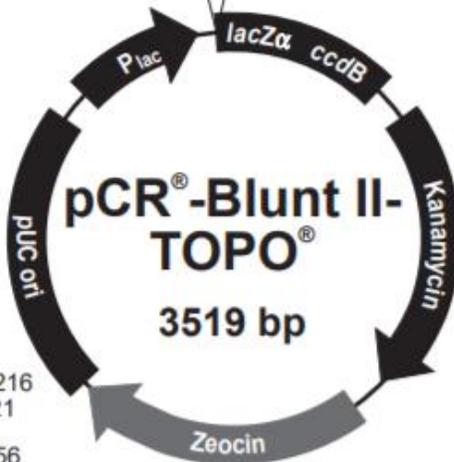
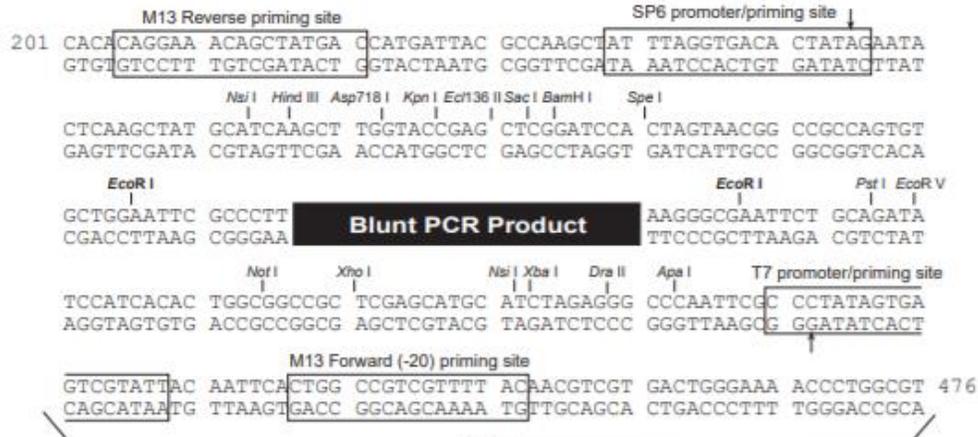
Llevar volumen a 1L y agregar de 5 a 10 g de agar, dependiendo del experimento.

Autoclavar 20 min a 121 C

Procedimiento para germinación de semillas *in vitro* en placas de Petri

- Trabajar siempre en flujo laminar, preferentemente horizontal
- Verter el medio luego de autoclavado, hasta aproximadamente la mitad de la altura de la placa. Dejar solidificando las placas a temperatura ambiente. Si las placas no se van a utilizar en el momento, envolverlas en plástico y guardarlas a 4 C.
- Esterilizar las semillas en tubos eppendorf incubándolas por 20 min. en 50% de hipoclorito de sodio comercial (agua jane, 40 g/L), con el agregado del detergente Tween 20 (0.05%).
- Lavar bien los residuos de hipoclorito con agua destilada estéril, 5-7 veces.
- Para plantar pocas densidades de semillas individuales, succionar las semillas con una pipeta p1000 y liberarlas en el agar una a una. Para plantar semillas en densidades altas, mezclarlas con agua destilada estéril o 0.1% top agar autoclavado y enfriado, verterlas sobre la placa e inmediatamente distribuirlas homogéneamente sobre la superficie de la placa usando una punta de pipeta. Remover el exceso de agua o de top agar y dejar secar un poco antes de colocar la tapa.
- Colocar cinta Micropore en todo el perímetro de la placa para prevenir la desecación, permitiendo cierta aeración.
- Colocar las placas 3 días a 4 °C.
- Trasferir las placas al cuarto de cultivo, con una iluminación de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ y temperatura de 22-23 °C.

13.2 Mapa del vector comercial pCR-Blunt II- TOPO de Invitrogen de 3519 pb

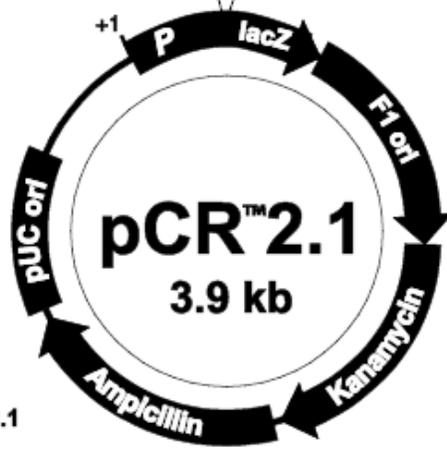
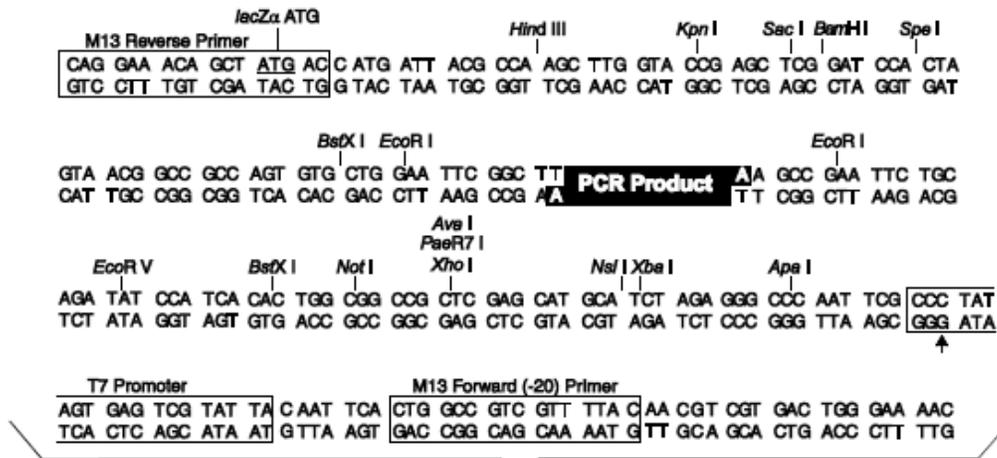


Comments for pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]
3519 nucleotides

- lac* promoter/operator region: bases 95-216
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- LacZ-alpha ORF: bases 217-576
- SP6 promoter priming site: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 269-399
- TOPO[®]-Cloning site: bases 336-337
- T7 promoter priming site: bases 406-425
- M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
- Fusion joint: bases 577-585
- ccdB* lethal gene ORF: bases 586-888
- kan* gene: bases 1099-2031
- kan* promoter: bases 1099-1236
- Kanamycin resistance gene ORF: bases 1237-2031
- Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
- pUC origin: bases 2724-3397



13.3 Mapa del vector comercial de Invitrogen pCR2.1 de 3900 pb.

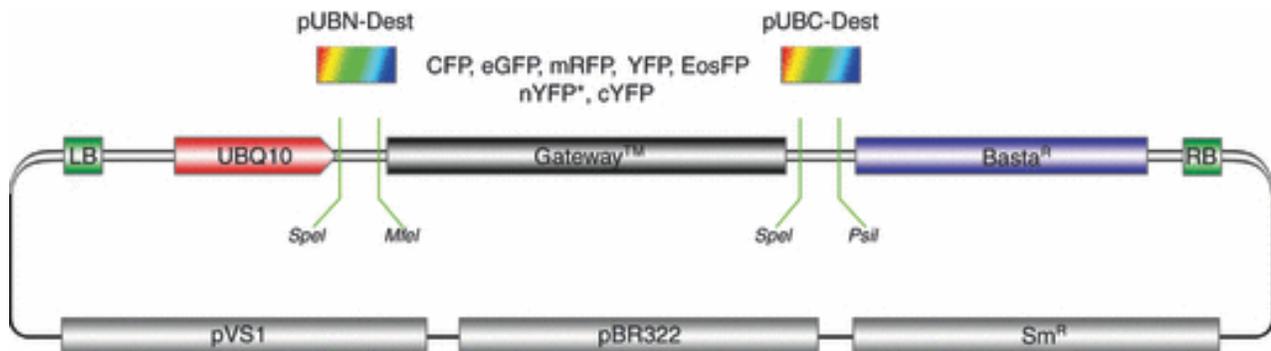


Comments for pCR™2.1
3929 nucleotides

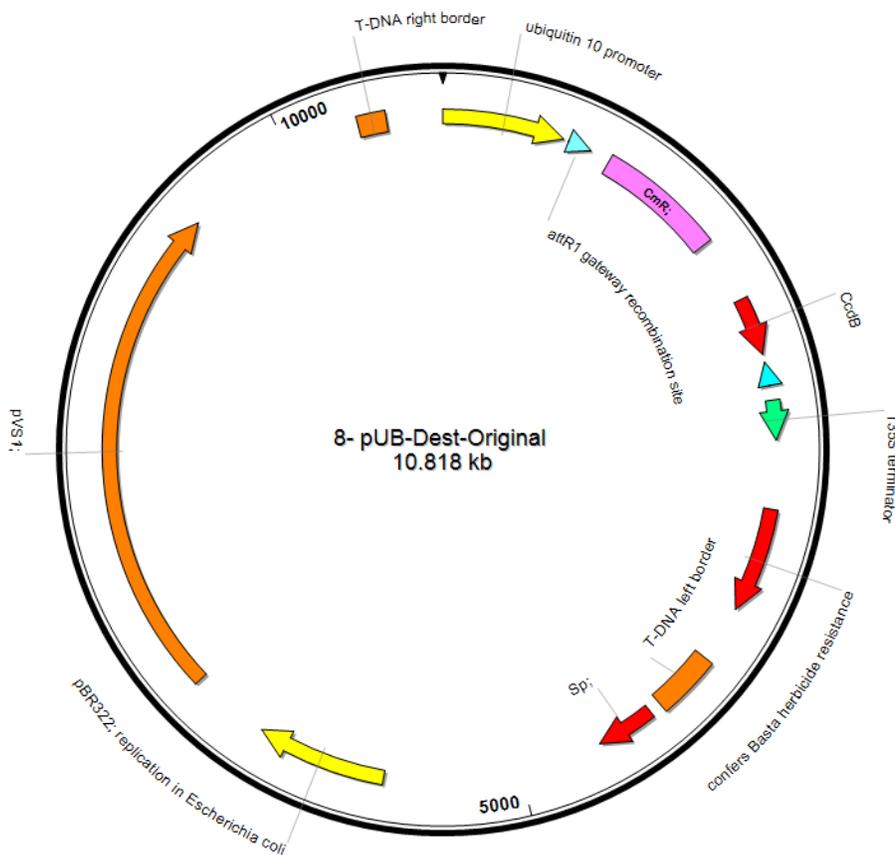
- LacZα gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
- pUC origin: bases 3134-3807

13.4 Representación esquemática de la serie de vectores pUbi – Dest

De estos vectores usamos el backbone que incluyen los bordes derecho e izquierdo (LB y RB), pVS1: secuencia de replicación en *Agrobacterium tumefaciens*; pBR322: origen de replicación para elevado número de copias en *Escherichia coli* y Sm^R: gen de aminoglucósido-3-adeniltransferasa que confiere resistencia a estreptomicina o espectinomina en bacterias. [123]. GenBank: KC441463.1.



13.5 Mapa del vector pUB-DESTdesarmado



13.6 Listado de cebadores usados en las reacciones de PCR

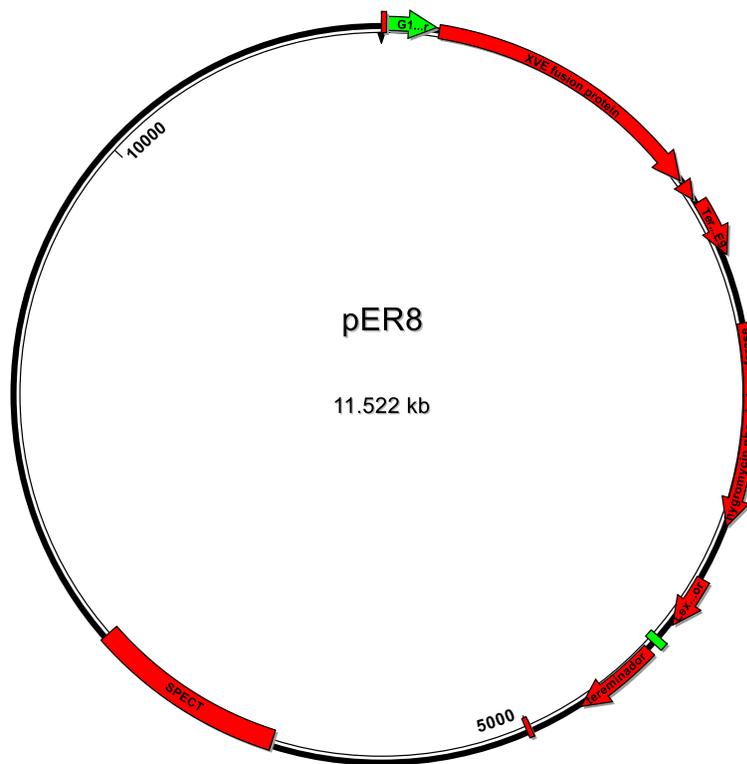
Tabla 155: Listado de cebadores usado en las reacciones de PCR

Nombre	Secuencia del cebador (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)
FGmubi-1001	GGGCCCAATATAACAACGACGTC	23	58,0
RGmUbi-3	CTGTGCGAGTCAACAATCACAGATAA	25	54,8
R_GmUbi_a	CCCGGGCTGTGCGAGTCAAC	19	57,6
F_GmUbi_a	CAATATAACAACGACGTCGTAACAG	25	54,4
GmUbi_FW	AGCTTGAATTCCTGCAGGGCCCAATATAACAAC	33	50,7
GmUbi_RV	GGTGAAGGTGATCCCGGGCTGTC	23	50,7
gus_FW	GTTGACTCGACAGCCCATGTTACGTCCTGTAGAAA	35	50,6
gus_RV	AGGTGAAGGTGATCCCTCATTGTTTGCTCCC	32	50,6
R-ubi	CAGGAATTCAGCTTCCATGGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG	44	67,5
F-ubi	CTTGAATTCCTGCAGTCTAGAGATAATTCAATTCGGCGTTAATT	44	62,7
FGmUbi-1148	CTTTTCAATTATTCTTTTCTGGTCC	25	50,8
RGmUbi-1	CTGTGCGAGTCAACAATCA	18	49,3
F-vspB	CCTTCACCTCTCTCAACAATCTAG	24	54,5
R vspB	GCCCCAAACTGAACAACCCAAT	22	56,6
Tvsp_FW	CGGGATCACCTTACCTCTCTCAAC	25	53,0
Tvsp_RV	GCGAATTCGCCCAAACTGAACAAC	25	53,0
F_Blunt	GGATCTAGAAGTAACGGCCGCCAGTGTGCT	30	66,0
R_Blunt	TGCTCTAGAGGCCGCCAGTGTGCATGGATA	29	65,5
FoGmDHN2	AGAACCATTGACGGCACTA	22	60,3
ReGmDHN2	GGTTTCCTATATAAATAAACCCC	23	57,5
FW-NotGmUbi-2	AACGCGGCCGCAACAGATAAAGCGAAGCTTG	31	67,2
RV-Kpn GmUbi	acaGGTACCTGTGCGAGTCAACAATCAC	27	60
FW-NotGmDHN-1	TTGGCGGCCGAGAGATACATAATATGCAATG	32	63,4
RV-KPNGmDHN	acaGGTACCGGGTTTATTTATATAGGAAAC	31	57,8
FWAfe-G10b	ggtAGCGCTaacactgatagtttaaactg	29	57,3

RVSpe-TerPrCb	gatactagttcccgcttcagttcc	27	58,9
FoTVSPseq	GGCCACCATAGTAGACTGACAA	22	56,3
GFP XhoI-fw	ttaCtcgagatgggtaaggagaagaactttcac	36	61,6
GFP Ascl-rv	tGgcgcgcctatttgtagttcatccatgc	32	63,4
Scaff-fwAfel	ttagcgctGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTC	38	62,6
Scaff-rvAfel	ttagcgctGAGCAGCTTGAGCTTGATCAG	31	64,9
ReTVSPseq	TAAAGCCGGTAAGAGACAACAA	22	54,1
FoGmUBIseq	CGTTGACAAAAAGCCTTATTCG	22	52,8
ReGmUbiseq	AGGGGTGTGGGCGTTTTAT	20	59,4
FoBARIxseq	CGTTATTTATGAGATGGGTTTT	22	48,8
ReBARIxseq	GTGACCTTAGGCGACTTTTG	20	53,7
M13_FW (-20)	d[GTAAAACGACGGCCAG]	16	50,7
M13RV	d[CAGGAAACAGCTATGAC]	17	47
RV_Scaff	ATCACAGGCAGCAACGCTCTG	21	60,4
FW_tNOS_YR	TCCTGTTGCCGGTCTTGCGA	20	61,8
GFP XhoI-fw	ttaCtcgagatgggtaaggagaagaactttcac	36	61,6
GFP Ascl-rv	tGgcgcgcctatttgtagttcatccatgc	32	63,4
F_hyg_NOS	CAAGACCTGCCTGAAACCGAAC	22	58,5
R_hyg_OCS	TTTGTATTGTGGCGCTCTATCAT	24	54,9
RV_eGFP	AGTCGTGCTGCTTCATGTGG	20	58
FW_syntext	GGGAATAAGGGCGACACGGA	20	59,5

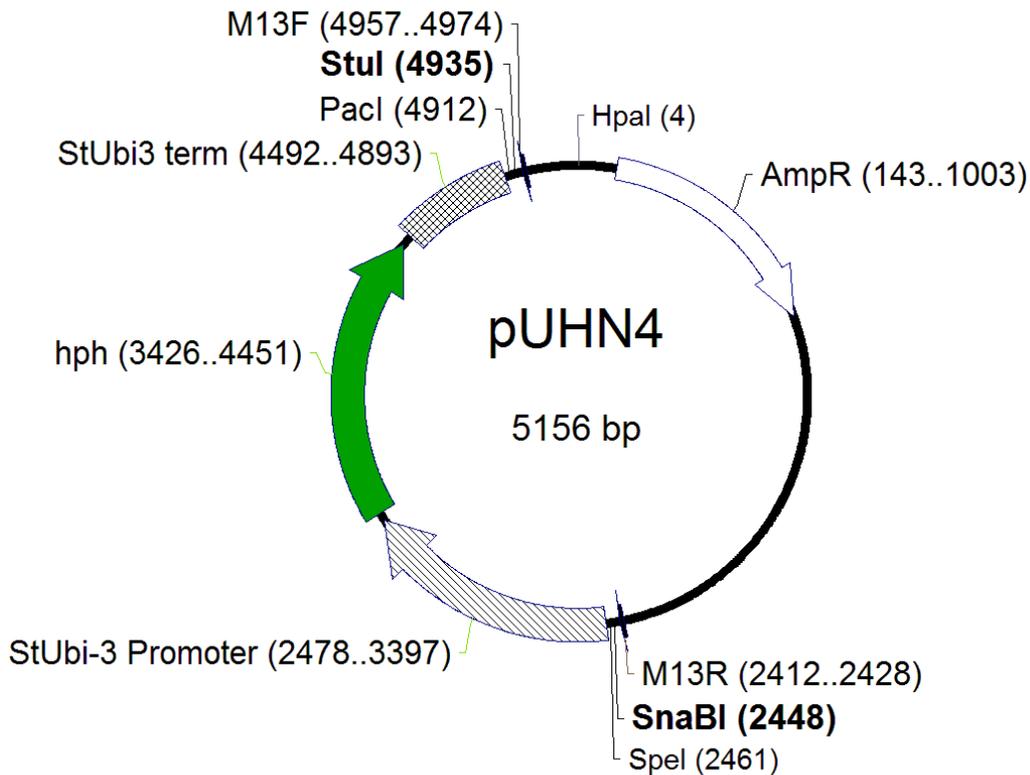
El valor de T_m fue calculado para las reacciones con las herramientas disponibles en la página web de IDT (<https://www.idtdna.com>)

13.7 Mapa del vector pER8



Secuencia tomada de los autores [116]

13.8 Mapa del vector pUHN4



Tomado de [124]

Promotor y terminador de papa para el gen de resistencia a higromicina

- ampR: 143..1003
- StUbi3 Promoter: 2478..3397
- hph: 3426..4451
- StUbi3 Terminator: 4492..4900

13.9 Secuencia de ADN de los vectores para biolística

13.9.1 pSBio-pGmUbi

Vector de ADN circular de 12921 pb

Definición: Vector de transformación genética de plantas por biolística, para expresar genes reporteros (*eGFP-GUS*) constitutivamente en soja. Secuencia completa.

Fuente: Secuencia artificial, vector

1..156 - “Fragmento derivado de pBluescript SK(-)” – Incluye dos sitios de restricción del vector *SrfI* y *NotI*

Región reguladora **157..1073** (916 pb) – promotor

/note= “pGmUbi” – promotor constitutivo del gen de poliubiquitina de soja.

CDS **1089..3620** (2531 pb)

Producto=“eGFP-GUS”

Región reguladora **3629..4206** (578 pb) – clase de regulador “terminador”

/note= “tGmVspB”

Complemento (4220..4253) 34 pb

/note= “/oxP1” sitio complementario reconocido por la Cre recombinasa.

Región reguladora **4267..4509** (243 pb) – clase de regulador “promotor”

/note= “G10-90 promoter”

CDS **4525..6090** (1566 pb)

/producto=“ XVE”

Id de proteína= “AAK08505.1”

/Traducción=

“MKALTARQQEVFDLIRDHISQTGMPPTRAEIAQRLGFRSPNAAEEHLKALARKGVIEIVSGASRGIRLLQEEEEGLPLVGRVAAGEPSSAP
PTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDS PGPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMFTDALGIDEYGGDPSAGDMRAANLWPS
PLMIKRSKNSLALS LTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLLECAWLE
ILMIGLVWRSMHPVKLLFAPNLLLDRNQGKCVGEMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIH
RVLDKITDTLIHLMKAGLTLQQQHQLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVVPLYDLLLLLEMLDAHRLHAPTSRGGASVEETDQSH
LATAGSTSSHSLQKYIITGEAEGFPATVELPGEFPEMLAEIITNQIPKYSNGNIKKLLFHQKLDL”

Región reguladora **6116..6410** (295 pb) – tipo de regulador “terminador”

/note= “TerPeaRbsC”

Región reguladora **6453..7372** (920 pb) – tipo de regulador “promotor”

/note= “StUbi promoter”

CDS **7401..8426** (1026 pb)

/producto= “hph”

Id de proteína=

/traducción=”MKKPELTATSVEKFLIEKFDSVSDLMQLSEGEESRAFSFDVGGRGYVLRVNSCADGFYKDRYVYRHFASAALPIPEVL
DIGAFSESLTYCISRRAQGVTLQDLPETELPAVLQPVAEAMDAIAAADLSQTSFGFGPFGPQGIGQYTTWRDFICAIADPHVYHWQTMDDT
VSASVAQALDELMLWAEDCPEVRHLVHADFGSNNVLTDNGRITAVIDWSEAMFGDSQYEVANIFFWRPWLACMEQQTRYFERRHPELAGSP
RLRAYMLRIGLDQLYQSLVDGNFDDAAWAQGRCDAIVRSGAGTVGRTQIARRSAAVWTDGCVEVLADSGNRRPSTRPRAKE”

Región reguladora **8467..8868** (402 pb) - tipo de regulador “promotor”

/note= “StUbi-3 ter”

Región reguladora **8897..9206** – tipo de regulador “operador fusionado a promotor”

/note= “LexA operator 35S prom”

CDS fragmentado (**9207..9638, 9809..10408**)

/producto= “cre”

Id de proteína= "[AAK08508.1](#)"

/traducción=

“MSNLLTVHQNLPALPVDATSDEVRKNLMDMFRDRQAFSEHTWKMLLSVCRSWAAWCKLNNRKWFPAPEDVDRDYLLYLQARGLAVKTIQQH
LGQLNMLHRRSGLPRPDSNAVSLVMRRIRKENVDAGERAKQALAFERTDFDQVRSLMENS DRCDIRNLAF LGIAYNTLLRIAETARIRV
KDISRTDGGRLIHIIGRTKTLVSTAGVEKALS LGVTKLVERWISVSGVADDPNNYLFRCVRKNGVAAPSATSQLSTRALEGI FEATHRLIY
GAKDDSGQRYLAWSGHSARVGAARDMARAGVSIPEIMQAGGWTNVNIVMNYIRNLDSETGAMVRLLEDGD”

Intrón **9639..9808**

/note= intrón "Arabidopsis KOR1 gene"

Región reguladora 10409..10661 (253 pb) – tipo de regulador “terminador”

/note= “TNos”

Complemento **10662..10698** (37 pb)

/note= “loxP2”

10699..12921 (2223 pb)- “Fragmento derivado de pBluescript SK(-)”

Secuencia completa del vector pSBio-pGmUbi

CACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCC
CGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCGCCACGTTTCGCCGCGCCCGGCAAGCGGCGCCAGGGCCCAATATAACAACGACGTCGTA
ACAGATAAAGCGAAGCTTGAAGGTGCATGTGACTCCGTCAAGATTACGAAACCGCCAAC TACCACGCAAATTGCAATTC TCAATTTCTTAG

AAGGACTCTCCGAAAATGCATCCAATACCAAAATATTACCCGTGTCATAGGCACCAAGTGACACCATACATGAACACGCGTCACAATATGAC
TGGAGAAGGGTTCCACACCTTATGCTATAAAAACGCCCCACACCCCTCCTCCTTCCTTCGCGAGTTCAATTTCCAATATATTTCCATTCTCTCTG
TGTATTTCCCTACCTCTCCCTTCAAGGTTAGTCGATTTCTTCTGTTTTCTTCTTCCATGAATTTGTGTATGTTCTTTGATCAA
TACGATGTTGATTTGATTTGTTTGGTTTTCATCGATCTTCAATTTTCATAATCAGATTCAGCTTTTATTATCTTTACAACAACGTC
CTAATTTGATGATTCTTTAATCGTAGATTTGCTCTAATTAGAGCTTTTTCATGTCCAGATCCCTTTACAACAAGCCTTAATTTGTTGATTCA
TTAATCGTAGATTAGGGCTTTTTTCATTGATTACTTCAGATCCGTTAAACGTAACCATAGATCAGGGCTTTTTCATGAATTACTTCAGATC
CGTTAAACAACAGCCTTATTTTTTATACTTCTGTGGTTTTCAAGAAATGTTTCAGATCCGTTGACAAAAAGCCTTATTCGTTGATTCTAT
ATCGTTTTTCGAGAGATATTGCTCAGATCTGTTAGCAACTGCCTTGTGTTGTTGATTCTATTGCCGTGGATTAGGGTTTTTTTTTCACGAGAT
TGCTTCAGATCCGTAAGATTACGTAATGGATTTTATTGATTCTGATTATCTGTGATTGTTGACTCGACAGAGGTACCaaactcgagatgg
tgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccacctcctggctcagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccgg
cgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccggtgccctggccaccctcgtg
accaccctgacctacggcgtcagctgtcagccgctaccccgaccacatgaagcagcagcacttctcgaagtcgccaatgccgaaggct
acgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccggcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctgggtgaaccg
catcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatctc
atggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactacc
agcagaacacccccatcgcgacggccccgtgctgctcccgaacacactacctgagcaccagctccgctcagcaaaagacccccaaagcga
gaagcgcatacactggtgacgaccacgcattaatggactcgggacccgagctcactcctggcagcagctgtaacaagccccgcatgtaactg
cctgtgaaaacccccaccgctgaaatcaaaaaactcgacggcctgtggcattcagctcggatcgcgaaaactgtggaattgatcagcgtt
gggtgggaaaagcgcgttacaagaaagccgggcaattgctgtgccaggcagtttcaacgatcagttcggcagatgcagatattcgtaattatgc
gggcaacgtctggtatcagcgcgaagtctttataccgaaaggttgggacggccagcgtatcgtgctgcgtttcgatgcggtcactcattac
ggcaaagtgtgggtcaataatcaggaagtgatggagcatcagggcggctatacggcatttgaagccgatgtcagcgcgtatgtaattgccc
ggaaaagtgtacgtatcaccgtttgtgtgaacaacgaactgaactggcagactatcccggcgggaatggtgattaccgacgaaaacggcaa
gaaaaagcagcttacttccatgatttcttaactatgcccgaatccatcgacgcgtaatgctctacaccacggcgaacacctgggtggac
gatatcaccgtggtgacgcatgtcggcgaagactgtaaccacgcgctcgttgactggcaggtgggtggcaatggtgatgtcagcgttgaac
tgcgatgacggatcaacaggtgggttgcaactggacaaggcactagcgggactttgcaagtggtgaatccgcacctctggcaaccgggtga
aggttatctctatgaactgtcgtcacagccaaaagccagacagagtgatctacccgcttcgctcggcatccggtcagtgggcagtg
aagggcaacagttcctgattaaccacaaaccgttctactttactggctttggctcgtcatgaagatgaggacttaccgtggcaaaaggtatcg
ataacgctgatggtgacgaccacgcattaatggactcgggacccactcctaccgtacctcgaattaccctacgctgaagagat
gctcagctgggcagatgaacatggcatcgtggtgattgatgaaactgctgctgctcggctttaaactctctttaggcattgggttcgaagcg
ggcaacaagccgaaagaactgtacagcgaagaggcagtcacacggggaaactcagcaagcgcacttacaggcgattaaagagctgatagcgc
gtgacaaaaaccaccaagcgtggtgatgtggagtattgccaacgaaccggataccctcggcaagtgacgggaatatttcgccactggc
ggaagcaacgcgtaaaactcgaccgacgcgtccgatcacctgctcaatgtaatggtctcgcagcgtcacaccgataccatcagcgtatctc
ttgatgtgctgctgacctgaaccgttattacggatggtatgtccaaagcggcagatttggaacggcagagaaggtactggaaaagaacttc
tggcctggcagagaaaactgcatcagccgattatcatcaccgaatcggcgtggatagcttagccgggctgcactcaatgtacaccgacat
gtggagtgaagatcagtgatggtggtgatgtatcaccgcgcttcttgatcgcgtcagcgcctcgtcgggtgaacaggtatggaat
ttcggcagttttgagacctcgcaaggcatttgccgcttggcggtaacaagaaagggatcttcaactcgcgaccgcaaacccaagctcggcgg
cttttctgctgcaaaaacgctggactggcatgaacttcggtgaaaaaccgcagcagggaaggcaacaatgaGGCGGCCctacctcacctc
tctcaacaacttagctagatggttctctctatctataatgtaataaggtatgctgatagcactattcaaataggagcattagctatggttgt
taatgctactttatggttggtaagtacctaagcactccagctacactcgttctctcttaccggctttaaactcctctctgccc
cttgttccatatttactaattatcccttctcactaaaagaaaattgttatcattaagattatgctcttagaacatagaggtctttaa
tgggtaggttttacaataaactaataataaaaatgtcataaaaatccacgtggttaacaaatgcagaaaatcgacgctcgtctattggaccga
cagttgctattaataataatgggccaccatagtagactgacaaaataaatacctgacaacatcgtttcactaaataacaacacaaaaaggg
agtgcattttccagggcatttttgaataaaaaacagttaaaagggagtgcaatagaaaatagggggtggaatagtgatttgagcag
tcttgaagcaaatgggttgTCTGCCCTAATCAtaactcgtatagcatacattatacgaagttatgAGCGCTaacactgatagtttaaac
tgaagggcggaaacgacaatctgatccaagctcaagctaaagcttgcatgctgcaggatcctggtggaactcctgcaagcttgccaagctgcccac
gtgcccacagctgcccacagctgctctagaggatccatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagaccct
tcctctataaaggaagttcatttctttggagaggacacgctgggatccccaatccggcggaatgaaagcgttaacggccagggaaca
agaggtggttgatctcatccgtgatcacatcagccagacaggtatgcccgcgacgctgcggaatcgcgacgctttggggtccgctcc
cacaacgctgagaaacatctgaagcgtcgtggcagcacaagggcttatgaaattgtttccggcgcatcagcgggattcgtctgttgc
aggaagaggaagagggttgcgctggtgaggtggtgctgcccgggtgaaccgtcgagcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gctccacttagacggcgaggcagctggcgatggcgcatgccgacgcgtagacgatttcgatctggacatgttgggggacggggattccccg
ggtccgggatttaccccccacgactccgccccctacggcgtctggataggccgacttcgagtttgagcagatggttaccgatgcccttg
gaattgacgagtagcgtggggatccgtctgctggagacatgagagctgccaacctttggccaagcccgtcatgatcaaacgctctaagaa
gaacagcctggccttgcctgacggccgaccagatggtcagtgcttgttggatgctgagccccatactctattccgagatgatcct
accagaccctcagtgaaactcctgatgagggcttactgaccaacctggcagacagggagctgggttcaatgatcaactgggccaagaggg
tgccaggctttgtggatttgaccctccatgatcaggtccaccttctagaatgtgcctggctagagatcctgatgattggtctcgtctggcg
ctccatggagcaccagtgaaactcgttctcctaaactgctcctggacaggaaccagggaaaatgtgtagagggcatggtggagatc
ttcgacatgctgctggctacatcatctcgttccgcatgatgaatctgcagggagaggagttgtgtgctcaaatctatttttgcctta
attctggagtgacacatttctgtccagaccctgaagctcctggaagagaaggaccatccaccgagctcctggacaagatcacagacac

tttgatccacctgatggccaaggcaggcctgaccctgcagcagcagcaccagcggctggcccagctcctcctcatcctcctcccacatcagc
cacatgagtaacaaaggcatggagcatctgtacagcatgaaagtgaagaacgtgggtgccctctatgacctgctgctggagatgctggacg
cccaccgctacatgcccactagccgtggaggggcatccgtggaggagacggaccaagccacttggccactgcccgtctacttcatc
gcattccttgcaaaagtattacatcacgggggagggcagaggggttccctgccacagctctgagagctccctggcgaattcccagagatgta
gctgaaatcatcactaatcagataccaaaatattcaaatggaatatcaaaaagcttctgtttcatcaaaaatgactcgacctaatgagt
tttcgctatcgaactgtgaaatggaaatggatggagaagattaatgaatgatattggctcctttgttcatctcaaatataattatttgg
tttttctctatttgggtgtgttgaatttgaattataagagatagcaaacatttgggtttgagtaaaaatgtgtcaaatcgtggcctc
taatgaccgaagttaatatgaggagtaaaacatcccaacaagccttggaaactgaaggcgggaaACTAGTgggcagatcgatccaaagcac
atacttatcgatttaaatttcatcgaagagattaatatcgaataatcatatacactttaataacatacaaaattttaatacatatac
tggatataaattaatttttaaagtcagatgaagatgtatcaaatcacatagggaaaaaataactattcataatttaaaaatagaaaag
atacatctagtgaatttaggtgcatgtatcaaatacattaggaaaaggcatatatcttgcagatctagataaataacgatttggattatgta
taatttccaaatgaaggtttatatctacttcagaaatacaaatatacttttatcagaacattcaacaaagcaacaaccaactagagtgaaa
aatacacattgttctctagacatacaaaatggagaaaagaatctcaaaatttagagaaacaaatctgaatttctagaagaaaaaataatt
atgcactttgctattgctcgaaaaaataatgaaagaaattagacttttttaaagatgttagactagatatactcaaaagctattaaagga
gtaatatcttcttacattaagtaatttttagttacagctctgtaatttaaagacacattttagattgtatctaaacttaaatgtatctagaat
acataatttgaatgcatcatatagatcgagacacccaattctcagaaaaacgtaaatatctaaacttaaatcttcaagctcaac
cttaagcccaatatacatttctcctcaagggccaagtggcacaacatgtcaggcccaattacgaagaaaagggtctgtaaaaccctaa
taaagtggcactggcagagcttacactctcattccatcaacaaagaaaccctaaaagccgcagcgcactgatctctcctccaggcgaa
ggatctcgactctaggggggcaataagatagaaaaagcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaagtcttctgatcgaaggttcgacag
cgtctccgacctgatgcagctctcggagggcgaagaatctcgtgcttccagcttcgatgtagggggcgtggatgtcctcggggtaaat
agctgcgccgatgggttctacaaagatcgttatgtttatcggcactttgcagcggcgcgctcccgattccggaagtgttgacattgggg
cattcagcagagcctgacctattgcatctcccgcctgcacaggggtgtcacgttgcaagacctgcctgaaaccgaactcccgcctgtct
gcagccggtcggcggaggccatggatgcatcgtcggccgatcttagccagacgagcgggttcggcccattcggaccgcaaggaatcgg
caatacactacatggcgtgatctcatatgcccgatgctgatccccatgtgtatcactggcaaacctgtgatggacgacaccgtcagtgct
ccgtcgcgacggctctcgatgagctgatgctttggggcagggactgccccgaagtccggcacctcgtgcacgaggatctcggctccaaca
tgtcctgacggcaaatggcgcataacagcggctcattgactggagcagggcagatgttcggggattcccaatcagaggtcggcaacatctc
ttctggagccggtgggtgcttctgatggagcagcagccttctcagcggaggcatccggagcttgcaggatcccgcggtcggctccggg
cgtatatgctccgcatgttcttgaccaactctatcagagcttgggtgacggcaatttcgatgatgcagcttgggcgagggctcgatgca
cgcaatcgtccgatccggagcgggactgtcgggctacacaaatcgcccgcagaagcgcggcgtctggaccgatggctgtgtagaagta
ctcggcgatagtgaaaccgacgcccagcactcgtccgagggcgaaggaatagagtagatgcccagccggatcaattcggcttgatccaa
atthtgattttaatgttttagcaaatgtcttatcagtttctcttttggcgaacggtaatttagagtttttttggctatatggatttctgt
ttttgatgtatgtgacaaccctcgggattgttgatttatcaaaaactaaagatttttggcttattgttctcgtctatttggatataat
cttagtttatatactttctagttctctacgtgttaaatgttcaacacactagcaatttggcctgccagcgtatggattatggaactatca
agtctgtgggatcgataaataatgcttctcaggaatttgagattttttatcatgtctttatgctcattcccttgagtataatagtaaaaa
aatagtaaatttaagcaataatgttaggtgctatgtgtctgtcgcagactatgggggtagcTAAATTAActgtacataaaccactgggt
ttatatacagcagtagtatacataaaccactgggtttatatacagcagctcagcgtactgtacataaaccactgggtttatatacagcag
tactgtacataaaccactgggtttatatacagcagctcagggtaagatagatagatgatatgatatggatgatatgggtggaatgcc
atgtaatatgctcgactctaggatcttcgcaagaccttctctatataaagaaagttcatttggagagggcagcagcagcagcagcagc
gactctagcctcgacatgtccaatttactgaccgtacacaaaatttgctcgtcattaccggctcgatgcaacagagtgatgaggttcgcaaga
acctgatggacatgttcagggatcgccagcggttttctgagcatacctggaaaatgcttctgtcggtttccgggtcgtggcggtcaggtg
caagttgaataaccggaaatgggttcccgcaaacctgaagatgttcgcgattatcttctatatacttcaggcgcgcggtctggcagtaaaa
actatccagcaacatttggccagcgtaaacatgcttcatcgtcgggtccgggtgccacgaccaagtgcagcaatgctgtttcactgggtta
tgccggcgatccgaaaagaaaacgttgatccgggtgaacgtgcaaaaacaggtcttagcgttcgaacgcaactgatctcagaccaggtaagtct
tcttttcttactctttacagaaatgtaaatctcagatataagtaagtaagatccaaaaatgacacttttaaccaagattgtacgaag
atctttttaaactccatttttattttgacatctaaattggatttaactcggccttgcgtatthtggcaggttcggtcactcatggaaaa
tagcgatcgtgccaggatatacgtaatctggcatttctggggattgcttataacacctgttacgtatagccgaaattgccaggatcagg
gttaaagatatactcagctactgacgggtgggagatgttaatccatattggcagaacgaaacgctggtagcaccgcaggtgtagagaagg
cacttagcctgggggtaactaaactggctcagcagcaggtttccgtctcgtgtgtagctgatccgaataaactacctgttttggcgggt
cagaaaaaatgggttggcgcgcatctgccaccagcagcgtatcaactcgcgcctggagggatttttgaagcaactcatcgattgatt
tacggcgctaaggatgactctggtcagagatacctggcctggctggacacagtgcccgtgtcggagcgcgagatattggcccgcgctg
gagttcaataaccggagatcatgcaagctgggtggctggaccaatgtaaatattgtcatgaaactatccgtaacctggatagtgaaacagg
ggcaatggctgcgctgctggaagatggcgatttagGatcgttcaaacatttggcaataaagtttcttaagattgaatcctgttgcgggtctt
gogattgattatcatataatctgttgaattacgttaagcatgtaataatcaacatgtaatgcatgacgttatttatgagatgggttttba
tgattagagctcccgcaattatacatttaacgcgatagaaaacaaaatatagcgcgcaaacactaggataaattatcgcgcgaggtgtcatc
tatgttactagatcatcataaacttctgatagcatacattatacgaagttatCCTCAGCaaGCCCGGGCAtGAGCTCCAGCTTTTGTTCCT
TTAGTGAGGGTTAATTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATA
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGT
CGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCGCTTCTCGT

CACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT
AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC
CCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGC
TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCT
TATCCGGTAACTATCTGCTTTCGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG
GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAG
CCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGA
TTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGAT
TTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCG
TCGTGTAGATAAATACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTT
ATCAGCAATAAACAGCCAGCCGCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGG
GAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTGGTA
TGGCTTCACTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCC
GATCGTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCACTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTTTCGCCGGGCTCAATACGGG
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTTAAAGTGTCTCATCTTGGAAAAAGTCTTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTT
GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGA
AGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTTATC
AGGGTTATGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC

13.9.2 pSBio-pGmDHN

1..156 - “Fragmento derivado de pBluescript SK(-)” – Incluye dos sitios de restricción del vector *SrfI* y *NotI*

Región reguladora 157..1709 (1553 pb) – promotor

/note= “pGmDHN” – promotor inducible del gen de dehidrina de soja: DHN- 27 kDa (Glyma.09G185500).

CDS 1725..2441 (717 pb)

Producto= “E-GFP”

/translation =

MVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKLTLLKFICTTGKLPVWPVTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE
GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVVKFEGDTLVNRIELKGDIFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADH
YQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYK

CDS 2448..4256 (1725 pb)

Producto = “GUS”

/translation =

MLRPVETPTREIKKLDGLWAFSLDRENCGIDQRWESALQESRAIAVPGSFNDQFADADIRNYAGNVVYQREVFIPKGWAGQRIVLRFDVA
THYKGVVWVNNQEVMEHQGGYTFEADVTPYVIAGKSVRITVCVNNELNWTIPPGMVIDENGKKKQSYFHDFFNAGIHRVMLYTTPTNT
WVDDITVVTHVAQDCNHASVDWQVVANGDVSVELRDADQQVVATGQGTSGTLQVNVNPHLWQFPEGYLVELCVTAKSQTECDIYPLRVGIRS
VAVKGGQFLINHKKPFYFTGFRHEDADLRGKGFNDVLMVHDHALMDWIGANSYRTSHYPYAEEMLDWADEHGIVVIDETAAVGFNLSLIG
FEAGNPKELYSEEAVNGETQQAHLQAIKELIARDKNHPSVVMWSIANEPDRPQVHGNISPLAEATRKLDPTRPITCVNVMFCDADHTDTI
SDLFDVLCNRYYGWYVQSGDLETAEKVLEKELLAWQEKLHQPIIITEYGVDTLAGLHSMYTDMWSEEYQCAWLDMYHRVDFRVS AVVGEQ
VWNFAFATSQGILRVGGNKKGIFTRDRKPKSAAFLQKRWTMGMFGEKPKQGGKQ

Región reguladora 4265..4842 (578 pb) – terminador

/note = "Ter GmVspB"

Complemento **4855..4889** (35 pb)

/note = loxP1

Región reguladora **4903..5145** (243 pb) - promotor

/note = "G10-90 promoter"

CDS **5161..6726** (1566 pb)

Producto = "XVE" fusion protein/rat glucocorticoid receptor

Id de proteína= "[AAK08505.1](#)"

/translation =

MKALTARQQEVFDLIRDHISQTGMPPTRAEIAQRLGFRSPNAAEHLKALARKGVIEIVSGASRGIRLLQEEEEGLPLVGRVAAGEPSSAP
PTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMLGDGDS PGPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMFTDALGIDEYGGDPSAGDMRAANLWPS
PLMIKRSKKNLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTTRPFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLLECWLE
ILMIGLVWRSMEHPVKLLFAPNLLLDRNQKCVEGMVEIFDMLLATSSRFMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIH
RVLDKITDTLIHLMAGLTLQQQHQLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVVPLYDLLLLLEMLDAHRLHAPTSRGGASVEETDQSH
LATAGSTSSHSLQKYYITGEAEGFPATV.ELPGEFPEMLAEIITNQIPKYSNGNIKKLLFHQK.LDL

Región reguladora **6752..7046** (295 pb)

/note = "Ter Pea RbsC"

Región reguladora **7089..8008** (920 pb)

/note = "StUbi promoter"

CDS **8037..9062** (1026 pb)

Producto = "hph"

/translation =

MKKPELTATSVEKFLIEKFDSVSDLMQLSEGEESRAFSFDVGGRGYVLRVNSCADGFYKDRYVYRHFASAALPIPEVLDIGAFSESLTYCI
SRRAQGVTLQDLPETELPAVLQPVAEAMDAIAAADLSQTSFGFGPGPQIGQYTTWRDFICAIADPHVYHWQTVMDDTVSASVAQALDELM
LWAEDCPEVRHLVHADFGSNNVLTDNGRITAVIDWSEAMFGDSQYEVANIFFWRPWLACMEQQTRYFERRHPELAGSPRLRAYMLRIGLDQ
LYQSLVDGNFDDAAWAQGRCDAIVRSGAGTVGRTQIARRSAAVWTDGCVLADSGNRRPSTRPRAKE

Región reguladora **9103..9504** (402 pb) - terminador

/note = "StUbi-3 ter"

Región reguladora **9533..9842** (310 pb) - promotor

/note = "LexA operator 35S prom"

CDS fragmentado (9843..10274, 10445..11044)

/producto= "cre"

Id de proteína= "AAK08508.1"

/traducción=

"MSNLLTVHQNLPALPVDATSDEVRKNLMDMFRDRQAFSEHTWKMLLSVCRSWAAWCKLNNRKFPAEPEDVRDYLLYLQARGLAVKTIQQH
LGQLNMLHRRSGLPRPSDSNAVSLVMRRIRKENVDAGERAKQALAFERTDFDQVRSLMENS DR CQDIRNLAFLGIAYNTLLRIAIEIARIRV
KDISRTDGGRLIHIIGRTKTLVSTAGVEKALS LGVTKLVERWISVSGVADDPNNYLFRCVRKNGVAAPSATSQ LSTRALEGI FEATHRLIY
GAKDDSGQRYLAWSGHSARVGAARDMARAGVSIPEIMQAGGWTNVNIVMNYIRNLDSETGAMVRLLEDGD"

Intrón 10275..10444

/note= intrón "Arabidopsis KOR1 gene"

Región reguladora 11045..11297 (253 pb) - terminador

/note = "TNos"

Complemento 11298..11334 (37 pb)

/note = "loxP2"

11335..13557 (2223 pb) - "Fragmento derivado de Bluescript SK(-)"

Secuencia completa del vector pSBio-pGmDHN

CACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCC
CGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTCTTCGCCACGTTTCGCCGGCGCCCGGGCaaGCGGCCGCaGGGGTTTATTTATATAGGAAACCAAG
CATAAAAATCTGGTCAAGGAGTCTTAAAAGTCTGACACGTGCTGCGTGGCGTTGAGGATGTAGCTGCCACGTGCATGGACACGTGTTGGTT
TCCTTTTTAGTGAAACCGTGTCATCGCTTCTGATTCATGGCTTGACACGTGTTGACTCTATCCAAAATTTGGATAAGTGTGTTAGCTAGCT
GGGCCATGGATGGATGTGAATTTAAGCGGTGTACCAGCTCTGGATTTTGTGTGACATCTGTGACAATTTGACAAAGATAACAAGAACCCCG
AATTAGTCACAAAAAAGTTTAGTGGCAACATGTTAAATTTTGATCATTGTATTTGCACAATCTTTAGCATGCACATAGCAGAACAAGT
GAACAACCAATATAATTTATATCAGTAATCTTGAATCTTTATCAAAAATATTTTGACGTGAGTATAACGTTTACAAAACACAGCTAATTTAA
GTTTTGAGAAATATAATTTAAATAAAATTGAACTCTATGATATGTAAAATAATAGTAAAACCTATATTAGCACAAAATATAAACTTTCCATATA
GCCTTGGAATTTGGCACCACGGATAACGGTAGACTAATGAAACGGACTACTTGATCTAACTTGGGTTGAGCTGATCCTAACCAAGAGAGTG
TTATTTATTTGGCTGAAATGTTGTTATGAGTAGGGTAGGTACTTTTTGCACCCGCTTTTTACTTATACATTTTTCTTTATTTTTTTTT
TGTATTTTATTTTAAAAATATTTTTTTTCAAGACTAATCTAGAACTTCATTTTTTACAACATAACTTTTTTCAAATTTATTTTTTTAA
TGAAATAATTTGTTCCGAAAGCTAAAATTTGAAAGTGTAAAATTTTTAATACTTTTTAAAAATAAATATAAAAAGAAGGCTTCCACGTT
TTTATTTTAGTGATGGCTGTTAACTTAAAGAAGGGATTGTGTGGGGTATTTGGTTTGTCTATGAATCAATATGTTTTTAAAAATAGAAAAT
AGATTGTAGTCAGGTGCTTAAACAACGTGTTAACCTCAAATGTTATCACCTAATCTGAATAGTCAAGTTTATGTTGAATCATATGAGGTG
ATAATATGGAAGAAGTCCCGGATGATCTTCATAAAATCAATTTTCATACTGCAATTAGAAAAGGATAGAGAAGTGAATTTGGATTTAATTTGTC
CGTGATGTTCAAGGAAATGTCCTAGCTTCGGCCACACAATTTTTTATAGTTTATTATTCAGTAATAGATGGGGAATAAAAATGCTCACAA
TTTAGCTGCTTTGTCTTTTACCTATTTAGGTAATTGCTTTATTGAGGAAGTCTCCTACAAGTTGGATCAAATCATTGCATATTATGTATCT
CTAGTGCCGTCAAAATGGGTTCTAGTTTGTGGGTGACCCGATCCATTTGTAACAGGTGAGTCAAGTTTAAATTTTTTTAATTTCAGTA
TTGATAAGTTTTCAGTCCGGCCCACTTAACCTGTGGGTAGGTGGGTCATCCGTGGGTTGGTGGGTCAGaGGTACCaaactcgagatggt
gagcaaggcgagagctgttcaccgggtggtgccccatcctggctcgagctggagcggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgcccc
gagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaaccaccggcaagctgcccgtgcccggccaccctcgtga
ccacctgacctacggcgtgagtgcttaccggctaccccgaccacatgaagcagcagcacttcttcaagtcggccatgcccgaaggcta
cgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagaccgcgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgc
atcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatca
tggccgacaagcagaagaacggcatcaagtgacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgagctgagctgcccggaccactacca

gcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcggcctgagcaaagacccccaacgag
aagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagccccgcatggttacgtc
ctgtagaacccccaacccgtgaaatcaaaaaactcgacggcctgtggcattcagctctggatcgcgaaaactgtggaattgatcagcgttg
gtgggaaagcgcgttacaagaaagccgggcaattgctgtgccaggcagtttaacgatcagttcgccgatgcagatattcgtaattatgcg
ggcaacgtctggtatcagcgcgaagtcttataaccgaaaggtggggcaggccagcgtatcgtgctgcttccgatgcccgtcactcattacg
gcaaagtgtgggtcaataatcaggaagtgtggagcatcagggcggctatacggcatttgaagccgatgtcacgcccgtatgttattgcccg
gaaaagtgtacgtatcacccgttgggtggaacaacgaactgaactggcagactatccccgggaatgggtattaccgacgaaaacggcaag
aaaaagcagctcttacttccatgatttcttaactatgcccgaatccatcgcagcgtaatgctctacaccacgcccgaacacctgggtggacg
atatcacccgtggtagcgtatgctgcgcaagactgtaaccaacgcgtctgtgactggcaggtgggtggccaatgggtgatgtcagcgttgaact
gcgtgatgcccgtacaacaggtgggtgcaactggacaaggcactagcgggactttgcaagtggtgaatccgcacctctggcaaccgggtgaa
ggttatctctatgaactgtgctcacagccaaaagccagacagagtgtgatattaccgcttcgctgcgcatccggctcagtgccagtgga
agggccaacagttcctgatlaaccacaacccgttctacttactggcttggctgctcatgaagatgcccgacttacgtggcaaggattcga
taacgtgctgatggtgacgaccacgcatlaattggactggattggggccaactcctaccgtacctcgcattacccttacgctgaagagatg
ctcactggcagatgaacatggcatcgtggtgattgatgaaactgctgctgctggccttaacctctcttaggcattgggttccgaagcgg
gcaacaagccgaaagaactgtacagcgaagaggcagtcacggggaaactcagcaagcgcacttacaggcagattaaagagctgatagcgcg
tgacaaaaaccaccaagcgtgggtgatgtggagtattgccaacgaaccggataaccgctccgcaagtgcacgggaatatttcgccactggcg
gaagcaacgcgtaaaactcgaccgacgcgtccgatcacctgctgcaatgtaattgctcgcagcgtcacaccgataccatcagcgtatctct
ttgatgtgctgtgctgaaccgttattacggatgggtatgtccaaagcggcgtattggaaacggcagagaaggtatggaaaaagaactctc
ggcctggcagagaaactcagcgcgtatcactcacccaatcagcgcgtggatagcgggctgcaactcaatgtacaccgacatg
tggagtgaagagtatcagtgctgctggatgtatcacccgctcttgatcgcgtcagcgcctgctgggtgaacaggtatggaatt
tcgcccattttgcgacctcgaaggcatattgctgctggcggtaacaagaaagggatcttcaactcgcgaccgcaaacggaagtgcggcggc
ttttctgctgcaaaaacgctggactggcatgaacttcggtgaaaaaccgcagcagggagcaacaatgaGGCGGCCctacctcacctct
ctcaacaatctagctagagtttgcctctctatctataatgtaataaggtatgctgatatgcactattcaaataggagcattagctatgtttgtt
aatgtcactttatgttatgtgggtaagtacctaagacactccacgtacctacgttggctctcttaccggctttaataaatcttctgccc
ttgttccatatttactaattatccctttctcactaaaagaaaattgttatcattaagtattagctttagaacatatgaggtctttaatt
gggtaggttttacaattaaactaatataaaatgtcataaaatccacgtggttaaacaaatgcagaaaatcgacgctcgtctattggaccgac
agttgctatataatggggccaccatagtagactgacaaataaattacctgacaacatcgtttcaactaaatacaaacacaaaaagggga
gtgcatttccagggcatttttgtaataaaaaacagttaaaagggagtgcaatagaaatataggggtgtgaaaatagtgatttgagcagct
cttgaagcaaatggggtgTCTGCCCTAATCAtaacttcgtatagcatacattatacgaagttatgAGCGCTaacactgatagtttaaact
gaagcgggaaacgacaactctgatccaagctcaagctaaagcttgcctgagcagatcgtggatccaagcttgcccagctgcccacg
tgccgacgctgcccagcagctgctctagaggatccactcagctagcgtaaaggtgacgcacaatcccactatccttcgcaagaccct
cctctataaaggaagttcaatttcttggagaggacacgctgggatcccaatcccgggcggaaatgaaagcgttaacgcccagggcaaca
gaggtgtttgatctcatccgtgatcacatcagccagacaggtatgcccgcagcgcgtgcggaatcgcgacgcttgggggtccgttccc
caaacgcccgtgaagaacatctgaaggcgtggcagcgaaggcgttattgaaattggttccggcgcacacgcccggattcgtctgttgca
ggaagaggaaaggggttgcctggttaggtcgtgtggctgcccgtgaaaccgtcgcagcgcaccccccgaccgatgtcagcctgggggacgag
ctccacttagacggcgaggcagtgccgatggcgcagcgcctagacgatttcgatctggacatgttgggggacggggattccccgg
gtcccgggatttccccccacgactccgccccctacggcgcctctggatattggccgacttcgagtttgagcagatgtttaccgatgcccttg
aattgacgagtagcgggtgggatccgtctgctggagacatgagagctgcaaacctttggccaagcccgctcatgatcaaacgctctaagaag
aacagcctggccttgtccctgacggccgaccagatggctcagtgccctgttggatgctgagcccccaactctattccgagatgatcccta
ccagaccctcagtgaaagcttcgatgatgggcttactgaccaacctggcagacagggagctgggtccatgatcaactggcggaagaggggt
gccaggcttgtggatttgacctccatgatcaggtccaccttctagaatgtgctggctagagatcctgatgattgggtctcgtctggcgc
tccatggagcaccagtgaaagctactgtttgctcctaacttgccttggacaggaaccagggaaaatgtgtagagggcattgggtggagatct
tcgacatgctgctggctacatcatctcgggtccgcatgtaactcgcagggagaggagttgtgtgctcctcaaatctatattttgcttaa
ttctggagtgtacacatttctgtccagcaccctgaagtctctggaagagaaggaccatataccaccgagctctggacaagatcacagacact
ttgatccacctgatggccaaggcaggcctgacctgcagcagcagcaccagggctggcccagctcctcctcatcctctcccacatcaggc
acatgagtaacaaaggcatggagcatctgtacagcatgaagtgaagaacgtgggtgccctctatgacctgctgctggagatgctggacgc
ccaccgctacatgcccactagccgtggagggcatccgtggaggagacggaccaaaagccacttggccactgcccgtctacttcatcg
cattccttgcaaaagtattacatcacgggggagggcagagggtttccctgccacagctctgagagctccctggcgaattcccagagatgtag
ctgaaatcatcactaatcagataccaaaatattcaaatggaaatataaaaagcttctgtttcatcaaaaatgactcgacctaaactgagta
agctagcttgttcgagtatattggcattgggaaaactgttttcttaccatattgttggcttgaatttactgtgtttttattccggtt
ttcgcctatcgaactgtgaaatggaaatggatggagaagagttaatgaatgatattggctctttgttctcctcaaatataattttgtt
ttttctctattttgttgtgttgaatttgaattataagagatatgcaaacattttgttttgagtaaaaatgtgtcaaatcgtggcctct
aatgaccgaagttaatatgaggagtaaaacatcccaacaagcttggaaactgaaggcgggaaACTAGTgggcagatcgatccaaagcaca
tacttatcgatttaaatttcatcgaagagattaatatcgaataatcatacatactttaaatacatacaaaattttaaatacatatatac
ggtatataatataatttttaagtcagatgtagatgatacaatacagatggaaaaaataactattcataaattttaaataatagaaaaa
tcatctagtgaaatttagtgcattcaaatacattagaaaaggcacaatatcttgatctagataaataacgattttgatttatgtat
aatttccaaatgaaggtttatctacttcagaaataacataacttttatcagaacattcaacaaagcaacaaccaactagagtgaaaa
atacacattgttctctagacatacaaaattgagaaaagaatctcaaaatttagagaaaacaaatctgaatttctagaagaaaaaataatta
tgcactttgctattgctcgaaaaaataatgaaagaaatttagacttttttaaaagatgttagactagataactcaaaagctattaagggag

taatattcttcttacattaagtatttttagttacagtcctgtaattaaagacacatttttagattgtatctaaacttaaatgtatctagaata
catatatttgaatgcatcatatacatgtatccgacacaccaatttctcataaaaaacgtaatatcctaaactaattttatccttcaagtcaac
ttaagcccaatatacattttcatctctctaaaggccaagtggcacaacaaatgtcaggcccaattacgaagaaaagggttgtaaaacccta
aaagtggcactggcagagcttacactctcattccatcaacaaagaaacccctaaaagccgagcgcactgatttctctcctccaggcgaag
gatctcgactctaggggggcaataagatatgaaaaagcctgaactcaccgagcgtctgtcgagaagtctctgatcgaaaagttcgacagc
gtctccgacctgatgcagctctcggaggcgaagaatctcgtgctttcagcttcgatgtaggagggcgtggatagtctcggggtaata
gctgcccgatggtttctacaaagatcgttatgtttatcggcactttgcatcggccgctcccattccggaagtgttgacattggggc
attcagcagagcctgacctattgcatctccgcccgtgcacaggggtcacggttgaagacctgctgaaaccgaactgccgctgttctg
cagccggtcgcggaggccatggatgcgatcgtcgcggccgatcttagccagacgagcgggttcggccattcggaccgcaaggaatcggtc
aatacactacatggcgtgatttcatatgcgcgattgctgatccccatgtgtatcactggcaaacctgtgatggacgacaccgtcagtgctc
cgtcgcgacagctctcgatgagctgatgctttggggcagaggactgccccgaagtccggcacctcgtgcacgaggatttccgctccaaca
gtcctgacggacaatggccgataacagcggctcattgactggagcggagcgtgttcggggattcccaatacagaggtcgccaacatctct
tctggaggccgtggttggctgtatggagcagcagacgcctacttcgagcggaggcatccggagcttgaggatcgccgcccgtccgggc
gtatatgctccgattggtcttgaccaactctatcagagcttgggtgacggcaatctcgatgatgcagcttgggcccagggctcgatgcgac
gcaatcgtccgatccggagccgggactgtcgggctacacaaatcgcccgcagaagcggcggcgtctggaccgatggctgtgtagaagtac
tcgccgatagtggaaaccgacgccccagcactcgtccgaggcacaaggaatagagtagatgcgaccgggatcaattcggcttgatccaaa
ttttgattttaaagtttagcaaatgtcttatcagtttctcttttctcgaacggtaatttagagtttttttctctataatggattttcgtt
ttgatgtatgtgacaaccctcgggattgttgatttatttcaaaccaagagtttttctcttattgttctcgtctattttggatatacaatc
ttagttttatctcttttctcagctgtttaaattgttcaaacacacagcaatttggcctgcagcgtatggattatggaactcaaa
gtctgtgggacgataaataatgcttctcaggaatttgagattttttatcatgctctttatgctcattcccttgagtataatagtaaaaa
atagtaaatttaagcaataatgtaggtgctatgtgtctgtcgcgagactattgggggtagcTTAATTAAactgtacatataaaccactggtt
tatatacagcagctactgtacatataaaccactggttttatatacagcagctcgacgtactgtacatataaaccactggttttatatacagcag
actgtacatataaaccactggttttatatacagcagctcaggttaagattagatatggatagtatatggatagtatatggtggtaatgcca
tgtaatatgctcgactctaggatcttcgcaagacccttctctatataaggaagttcatttcatcttgagaggacacgctgaagctagtcg
actctagcctcgacatgtccaatttactgaccgtacacaaaatttgcctgcattaccggctgatgcaacgagtgatgaggttcgcaagaa
cctgatggacatggtcagggatcgccaggcgttttctgagcatacctggaatgcttctgtccggttgcggctcgtggcggcagtggtgc
aagttgaataaccggaaatgggttcccgcagaacctgaagatgttcgcgattatcttctatcttccaggcgcggctcggcagtaaaaa
ctatccagcaacatttgggcccagctaaacatgcttcatcgtcgggtccgggctgccacgaccaagtgacagcaatgctgtttcactggttat
gcccgggatccgaaaagaaaacgttgatgcccgtgaaactgcaaacagggctctagcgttcgaacgcactgatttcgaccaggtaagtctt
cttttcttactctttacagaaatggtaatctcagatataagtaaggaatgcaaaaatgacacttttaaccaagattgtacgaaga
cttttttaactccatttttattttgacatctaaattggatthaactcggccttgcctgtattttggcaggttcgctcactcattggaat
agcgtatctgcccagatatacgtaatctggcatttctgggattgcttataaacaccctgttacgtatagccgaaattgcccaggtcaggg
ttaagatatactcacgtactgacggtgggagaatgtaattccatattggcagaacgaaaacgctgggttagcaccgaggtgtagagaaggc
acttagcctggggtaactaaactggctcagcagatggatttccgctctctggtgtagctgatgatccgaataaactacctggttttgcgggct
agaaaaatgggtgttgcgcgccatctgccaccagccagctatcaactcgcgcctggaagggtttttgagcaactcatcgattgattt
acggcgttaaggatgactcgtgctcagagatacctggcctggtctggacacagtgcccgtcggagccgcgcgagatagggccgcgctgg
agtttcaataccggagatcatgcaagctggtggctggaccaatgtaaatattgtcatgaaactatccgtaacctggatagtaaacaggg
gcaatggtgcgctgctggaagatggcgattagGatcgttcaaacatttggcaataaagtttcttaagattgaaacctggttgcggctctg
cgatgattatcatataatttctgttgaattacggttaagcatgtaataattaacatgtaatgcatgacgttatttatgagatgggtttttat
gattagatcccgaattatacatttaacgcgatagaaaacaaaatatagcgcgcaaacctaggataaattatcgcgcgcccgtgtcatct
atgttactagatcatcataacttctgtatagcatacattatacgaagttatCCTCAGCaaGCCGGGCatGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTT
TAGTGAGGGTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATAC
GAGCCGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTTGCCTTGCCTCAGCTCCCGCTTTCCAGTC
GGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTC
ACTGACTCGTGCCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA
ACGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCC
CCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGC
TCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCT
CAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCTT
ATCCGGTAACTATCGTCTTGTGAGTCCAACCCGGTAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGTTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGAT
TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATT
TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTACTCAGCATGTGCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCTGACTCCCGT
CTGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCTACCTGCAATGATACCGGAGACCCACGCTCACCGCTCCAGATTTA
TCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGG
AAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTAT
GGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTCTCCG

ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGAT
GCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGA
TAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG
AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAA
GGCAAAATGCCGCAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCA
GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGC

13.10 Vectores binarios

13.10.1 pSBin-pGmUbi

Vector de ADN circular de 17256 pb

Definición: Vector binario de transformación genética de plantas por el método biológico de *Agrobacterium tumefaciens*, para expresar genes reporteros (*eGFP-GUS*) constitutivamente en soja. Secuencia completa.

Fuente: Secuencia artificial, vector

Región reguladora **16..932** (917 pb) - promotor

/note = "pGmUbi"

CDS **948..1664** (717 pb)

/producto = "E-GFP"

/translation =

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE
GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGDIFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGQSVQLADH
YQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYK

CDS **1671..3479** (1809 pb)

/producto = GUS

/translation =

MLRPVETPTREIKKLDGLWAFSLDRENCGIDQRWESALQESRAIAVPGSFNDQFADADIRNYAGNVWYQREVFIPKGWAGQRIVLRFDV
THYGKVVVNNQEVMEHQGGYTPFEADVTPYVIAGKSVRI TVCVNNELNWQTI PPGMVIDENGKKKQSYFHDFFNAGIHRVSVMLYTTPTNT
WVDDITVVTHVAQDCNHASVDWQVVANGDVSVELRDADQGVVATGQGTSGTLQVVNPHLWQPGEGYLYELCVTAKSQTECDIYPLRVGIRS
VAVKGQQFLINH KPFYFTGFRHEDADLRGKGF DNVL MVHDHALMDWIGANSYRTSHYPYAEMLDWADHGVVVIDETA AVGFNLSLGIG
FEAGNPKELYSEEAVNGETQQAHLQAIKELIARDKNHPSVVMWSIANEPDTRPQVHGNI SPLAEATRKLDPTRPITCVNVMFCDAHTDTI
SDLFDVLCNRYYGWYVQSGDLETAEKVLEKELLAWQEKLHQPI IITEYGVDTLAGLHSMY TDMWSEEYQCAWLDMYHRVFD RVS AVVGEQ
VWNFADFATSQGILRVGGNKKGIFTRDRKPKSAAFL LQKRWTGMNFGEKPPQQGGKQ

Región reguladora **3488..4065** (578pb) - terminador

/note = Ter GmVspB

Complemento **(4078..4112)** 34 pb

/note= "/oxP1" sitio complementario reconocido por la Cre recombinasa.

Región reguladora **4126..4368** (243 pb) – clase de regulador "promotor"

/note= "G10-90 promoter"

CDS **4384..5949** (1566 pb)

/producto=" XVE"

Id de proteína= "AAK08505.1"

/Traducción=

"MKALTARQQEVFDLIRDHISQTMPPTRAEIAQRLGFRSPNAEEHLKALARKGVIEIVSGASRGIRLLQEEEEGLPLVGRVAAGEPSSAP
PTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDS PGPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMFTDALGIDEYGGDPSAGDMRAANLWPS
PLMIKRSKKNLALSLTADQMVSAALLDAEPPILYSEYDPTRFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLLECAWLE
ILMIGLVWRSMEHVPKLLFAPNLLLDRNQKGCVEGMVEIFDMLLATSSRFMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLLSSTLKSLEEKDHIH
RVLDKITDTLIHLMKAGLTLQQQHQLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMCKKNVVPVLYDLLEMLDAHRLHAPTSRGGASVEETDQSH
LATAGSTSSHSLQKYYITGEAEGFP ATV-ELPGEFPEMLAEIITNQIPKYSNGNIKKLLFHQK-LDL"

Región reguladora **5975..6269** (295 pb) – tipo de regulador "terminador"

/note= "TerPeaRbsC"

Región reguladora **6312..7231** (920 pb) – tipo de regulador "promotor"

/note= "StUbi promoter"

CDS **7260..8285** (1026 pb)

/producto= "hph"

Id de proteína=

/traducción="MKKPELTATSVEKFLIEKFDSVSDLMQLSEGEESRAFSFDVGGRGYVLRVNSCADGFYKDRYVYRHFASAALPIPEVL
DIGAFSESLTYCISRRAQGVTLQDLPETELPAVLQPVAEAMDAIAAADLSQTSFGFGPFGPQIGQYTTWRDFICAIADPHVYHWQTMDDT
VSASVAQALDELMLWAEDCPEVRHLVHADFGSNNVLTNDRITAVIDWSEAMFGDSQYEVANIFFWRPWLACMEQQTRYFERRHPELAGSP
RLRAYMLRIGLDQLYQSLVDGNFDDAAWAQGRCDIVRSAGAGTVGRTQIARRSAAVWTDGCVLADSGNRRPSTRPRAKE"

Región reguladora **8756..9065** (402 pb) - tipo de regulador "promotor"

/note= "StUbi-3 ter"

Región reguladora **8756..9065**– tipo de regulador "operador fusionado a promotor"

/note= "LexA operator 35S prom"

CDS fragmentado (**9066..9497, 9668..10267**)

/producto= "cre"

Id de proteína= "AAK08508.1"

/traducción=

"MSNLLTVHQNLPALPVDATSDEVKRNLMDFRDRQAFSEHTWKMLLSVCRSAAWCKLNNRKFPAEPEDVRDYLLYLQARGLAVKTIQQH
LGQLNMLHRRSGLPRPSDSNAVSLVMRRIRKENVDAGERAKQALAFERTDFDQVRSMLMENS DRCDIRNLAF LGIAYNTLLRIAIEIARIV
KDISRDTGGRMILIHIGRTKTLVSTAGVEKALS LGVTKLVERWISVSGVADDPNNYLFRCVRKNGVAAPSATSQ LSTRALEGI FEATHRLIY
GAKDDSGQRYLAWSGHSARVGAARDMARAGVSIPEIMQAGGWTNVNIVMNYIRNLDSETGAMVRLLEDGD"

Intrón **9498..9667**

/note= intrón "Arabidopsis KOR1 gene"

Región reguladora **10268..10520** (253 pb) – tipo de regulador “terminador”

/note= “TNos”

Complemento **10521..10557** (37 pb)

/note= “loxP2”

Vector binario base **10574..17253** (6680 pb) – fragmento proveniente del vector binario pUB desarmado con sitios Afel

Complemento **10667..10691** (25 pb)

/note = “LB”

Complemento **17172..17193** (22 pb)

/note = “RB”

Secuencia completa del vector pSBin-pGmUbi

GGGCaaGCGGCCGCaGGGCCCAATATAACAACGACGTCGTAACAGATAAAGCGAAGCTTGAAGGTGCATGTGACTCCGTCAAGATTACGAA
 ACCGCCAATACCACGCAAATTGCAATTCCAATTTCC TAGAAGGACTCTCCGAAAATGCATCCAATACCAAATATTACCCGTGTCATAGG
 CACCAAGTGACACCATAACATGAACACGCGTCACAATATGACTGGAGAAGGGTTCCACACCTTATGCTATAAAAACGCCCCACACCCCTCCTC
 CTTCTTCGCGAGTTCAATTCCAATATATTCATTCTCTCTGTGTATTTCCCTACCTCTCCCTTCAAGGTTAGTCGATTTCTTCTGTTTTTC
 TTCTTCGTTCTTTCCATGAATGTGTATGTTCTTTGATCAATACGATGTTGATTTGATTGTGTTTTGTTGGTTTTTCATCGATCTTCAATTT
 TCATAATCAGATTCAGCTTTTATTATCTTTACAACAACGTCCTTAATTTGATGATTTTAAATCGTAGATTTGCTCTAATTAGAGCTTTTT
 CATGTCAGATCCCTTTACAACAAGCCTTAATTGTTGATTCATTAATCGTAGATTAGGGCTTTTTTTCATTGATTAAGCTTCAAGAAAT
 GTAACCATAGATCAGGGCTTTTTCATGAATTAATTCAGATCCGTTAAACAACAGCCTTATTTTTTATACTTCTGTGGTTTTTCAAGAAAT
 GTTCAGATCCGTTGACAAAAAGCCTTATTCGTTGATTCTATATCGTTTTTCGAGAGATATTGCTCAGATCTGTTAGCAACTGCCTTGTGTTG
 TTGATTCTATTGCCGTGGATTAGGGTTTTTTTTACAGAGATTGCTTCAGATCCGTACTTAAGATTACGTAATGGATTTTGATTCTGATTTA
 TCTGTGATTGTTGACTCGACAGaGGTACCaaactcgagatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccacctcctggtcgag
 ctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatct
 gcaccaccggcaagctgcccgtgcccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgacgtgcttcagcgcgctaccccgaccacat
 gaagcagcagcacttcttcaagtcggccatgcccgaaggtacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacc
 cgcgcccaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggc
 acaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgcca
 caacatcgaggacggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccac
 taactgagcaccagtcggccctgagcaaaagacccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagtctgctgaccgcccgcgggatca
 ctctcggcatggacgagctgtacaagccccgcatggttacgtcctgtagaacccccaacccgtgaaatcaaaaaactcgacggcctgtgggg
 attcagtcctggatcgcgaaaactgtggaattgatcagcgttggtgggaaagcgcgttacagaagcgggcaattgctgtgcccaggcag
 ttaaacgatcagttcggcgatgcagatattcgtaattatgcgggcaacgtctggtatcagcgcgaagctttataaccgaaagggtgggca
 gccagcgtatcgtgctgcttctgatgcggtcactcattacggcaaggtggtgcaataatcaggaagtgtgagcatcagggcgggcta
 taogccatttgaagccgatgtcacgcccgtatgttattgcccggaaaaggtgacgtatcacccgttgggtgtaacaacgaactgaactggcag
 actatcccgcgggaatggtgattaccgacgaaaacggcaagaaaaagcagcttacttccatgatttctttaaactatgccggaatccatc
 gcagcgtaatgctctacaccacgcccgaacacctgggtggacgatatcacccgtggtgacgcatgtcgcgcaagactgtaaccacgctctgt
 tgactggcaggtggtggccaatggtgatgtcagcgttgaactgcgtgatcgggatcaacaggtggttgaactggacaagggcactagcggg
 actttgcaagtggtgaatccgcacctctggcaaccgggtgaaggttatctctatgaactgtgctgcacagccaaaagccagacagagtggt
 atatctaccgcttcgctcggcatccggtcagtggtgaggggcaacagttcctgattaaccacaacccgttctactttactggctt
 tggctgctcatgaagatcggcacttacgtggcaaggattcgataacgtgctgatggtgcaacgaccgcattaatggactggattggggcc
 aactcctaccgtacctcgacttacccttacgctgaagagatgctcagctgggcagatgaacatggcatcgtggtgattgatgaaactgctg

TTTAAGAGTTTAAATAAGTTTAAAGAGTTT TAGGCGGAAAAATCGCCTTTTTCTCTTTTATATCAGTCACTTACATGTGTGACCGGTTCC
 CCAATGTACGGCTTTGGGTTCCCAATGTACGGGTTCCGGTTCCCAATGTACGGCTTTGGGTTCCCAATGTACGTGCTATCCACAGGAAAGA
 GACCTTTTCGACCTTTTCCCCTGCTAGGGCAATTTGCCCTAGCATCTGCTCCGTACATTAGGAACCGGCGGATGCTTCGCCCTCGATCAG
 GTTGGCGTAGCGCATGACTAGGATCGGGCCAGCCTGCCCCGCTCCTCCTCAAATCGTACTCCGGCAGGTCAATTTGACCCGATCAGCTTG
 CGCACGGTGAAACAGAACTTCTTGAACCTCCGGCGCTGCCACTGCGTTCGTAGATCGTCTGAACAACCATCTGGCTTCTGCCTTGCCTG
 CGCGCGGCTGCCAGGCGGTAGAGAAAACGGCCGATGCCGGGATCGATCAAAAAGTAATCGGGGTGAACCGTCAGCACGTCCGGGTTCTT
 GCCTTCTGTGATCTCGCGGTACATCCAATCAGCTAGCTCGATCTCGATGTACTCCGGCCGCCCGGTTTCGCTCTTTACGATCTTGTAGCGG
 CTAATCAAGGCTTACCCTCGGATACCGTACCAGGCGGCGTTCTTGGCCTTCTTCGTACGCTGCATGGCAACGTGCGTGGTGTAAACC
 GAATGCAGGTTTCTACCAGGTCGTCTTTCTGCTTTCCGCCATCGGCTCGCCGGCAGAACTTGAGTACGTCGCAACGTGTGGACGGAACAC
 GCGGCCGGGCTTGTCTCCCTTCCCTTCCCGGTATCGGTTTATGATTTCGTTAGATGGGAAACCGCCATCAGTACCAGGTCGTAATCCCAC
 ACACTGGCCATGCCGGCCGCCCTGCGGAAACCTCTACGTGCCCGTCTGGAAGCTCGTAGCGGATCACCTCGCCAGCTCGTCCGGTACGCT
 TCGACAGACGAAAACGGCCAGTCCATGATGCTGCGACTATCGCGGGTGCACAGTATAGAGCATCGGAACGAAAAAATCTGGTTGCTC
 GTCGCCCTTGGGCGGCTTCTTAATCGACGGCGCACCGGCTGCCGGCGGTTGCCGGGATTCTTTGCGGATTCGATCAGCGCCGCTTGCCAC
 GATTACCGGGGCGTGTCTTGCCTCGATGCGTTGCCGTGGGCGGCCTGCGCGGCCTTCAACTTCTCCACCAGGTCATCACCCAGCGCCG
 CGCCGATTTGTACCGGGCCGGATGGTTTGCAGCCGTCACGCCGATTCTCGGGCTTGGGGGTTCCAGTGCATTGCAGGGCCGGCAGACAA
 CCCAGCCGCTTACGCTTGGCAACCGCCGCTTCTCCACACATGGGGCATTCACGGCGTCGGTGCCTGGTTGTCTTGATTTTCCATGCC
 GCCTCCTTTAGCCGCTAAAATTCATCTACTCATTTATTCATTTGCTCATTACTCTGGTAGCTGCGCGATGTATTAGATAGCAGCTCGGT
 AATGGTCTTGCTTGGCGTACCGGCTACATCTTACGCTTGGTGTGATCTCCGCCGCAACTGAAAGTTGACCCGCTTATGGCTGGCGTG
 TCTGCCAGGCTGGCCAACGTTGACAGCCTTGTGCTGCGTCCGCTCGGACGGCCGACCTAGCGTGTGTGTGCTTTTGTCTCATTTTCTCTT
 TACCTCATTAACCTCAAATGAGTTTTGATTTAATTTACGCGCCAGCGCCTGGACCTCGCGGGCAGCGTCCGCCCTCGGGTCTGATTCAAGA
 ACGGTTGTGCCGGCGGCGGAGTGCCTGGGTAGCTCACGCGCTGCGTGATACGGGACTCAAGAATGGGACGCTCGTACCAGGCGCAGCGCCT
 CGGCAACCTCACCGCCGATGCGCGTGCCTTTGATCGCCCGGACACGACAAAAGGCGCTTGTAGCCTTCCATCCGTGACCTCAATGCGCTG
 CTTAACAGCTCCACCAGGTCGGCGGTGGCCATATGTCGTAAGGGCTTGGCTGCACCGGAATCAGCACGAAGTCGGCTGCCTTGATCGCG
 GACACAGCAAGTCCGCCGCTGGGGCGCTCCGTCGATCACTACGAAGTCGCGCCGGCCGATGGCCTTACGTCGCGGTCAATCGTCGGGC
 GGTGATGCGGACAACGGTTAGCGGTTGATCTTCCCGCAGGCCGCCAATCGCGGGCACTGCCCTGGGGATCGGAATCGACTAACAGAAC
 ATCGGCCCGGCGAGTTGACGGGCGCGGCTAGATGGGTTGCGATGGTCTGCTTGCCTGACCCGCCTTTCTGGTTAAGTACAGCGATAACC
 TTCATGCGTTCCCTTGGCTATTTGTTTATTTACTCATCGCATCATATACGCAGCGACCGCATGACGCAAGCTGTTTTACTCAAATACACA
 TCACCTTTTGTAGACGGCGGCGCTCGGTTTCTTACGCGCCAAGCTGGCCGGCCAGGCGCCAGCTTGGCATCAGACAAACCGGCCAGGATT
 TCATGCAGCCGACGGTTGAGACGTGCGCGGGCGGCTCGAACACGTACCCGGCCGCGATCATCTCCGCCCTCGATCTCTTCGGTAATGAAAA
 ACGGTTCCCTTGGCCGCTTGGTGGGTTTATGCTTGTCTTGGCGTTTCACTTCCGCGGCCAGGGCCGCGGCTCGGCTCAAT
 GCGTCTCACGGAAGGCACCGCGCCGCTGGCCTCGGTGGGCTACTTCTCGTTCGCTCAAGTGCGGGTCAGGGTTCGAGCGATGCA
 CGCCAAGCAGTGCAGCCGCTCTTTACGGTGCAGCCTTCTTGGTTCGATCAGCTCGCGGGCGTGCAGATCTGTGCCGGGTGAGGGTAGG
 GCGGGGGCCAAACTTACGCTCGGGCCTTGGCGGCCTCGCGCCGCTCCGGGTGCGGTTCGATGATTAGGGAACGCTCGAACTCGGCAATG
 CCGGCAACACGGTCAACACCATGCGGCCGCGCGGCTGGTGGTGTGCGGCCACGGCTTGCAGGCTACGCAGGCCCCGCGCGGCTCCT
 GGATGCGCTCGGCAATGTCCAGTAGGTCGCGGGTGTGCGGGCCAGGCGGTCTAGCCTGGTCACTGTCAACAGTCCGACGGGCGTAGGTG
 GTCAAGCATCCTGGCCAGTCCGGGCGGTGCGCCTGGTGCGGTGTCTTCTCGGAAAACAGCTTGGTGCAGCCGGCCGCTGCAGTTG
 GCCGTTGGTTGGTCAAGTCTGGTTCGTCGTTGCTGACGCGGGCATAGCCAGCAGGCCAGCGGCGGCGCTTGTGTTATGGCGTAATGTC
 TCCGGTTCTAGTCGCAAGTATTCTACTTTATGCGACTAAAACACGCGACAAGAAAACGCCAGGAAAAGGGCAGGGCGGCGAGCCTGTGCGGT
 AACTTAGGACTTGTGCGACATGTGTTTTTTCAGAAAGACGGCTGCACTGAACGTGAGAAGCCGACTGCACTATAGCAGCGGAGGGGTTGGATC
 AAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTGATCCCGAGGGGAACCCCTGTTGGTTGGCATGCACATACAAATGGACGAACGG
 ATAACCTTTTACGCCCTTTTAAATATCCGTTATTCTAATAAACGCTTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACACT
 GATAGTTTAAACTGAAGGCGGAAACGACAATCTGATCCAAGCTCAAGCTGCTCagc

13.10.2 pSBin-pGmDHN

Vector de ADN circular de 17 892 pb

Definición: Vector binario de transformación genética de plantas por el método biológico de *Agrobacterium tumefaciens*, para expresar genes reporteros (*eGFP-GUS*) de forma inducible en soja. Secuencia completa.

Fuente: Secuencia artificial, vector

Región reguladora 24..1576 (1553 pb) - promotor

/note = "pGmDHN"

CDS **1584..2300** (717 pb)

/producto = "E-GFP"

/translation =

MVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTGKLPVPWPPTLVTTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE
GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSQLADH
YQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK

CDS **2307..4115** (1809 pb)

/producto = GUS

/translation =

MLRPVETPTREIKKLDGLWAFSLDRENCGIDQRWWESALQESRAIAVPGSFNDQFADADIRNYAGNVWYQREVFIPKGWAGQRIVLRFDVAV
THYGKVVVNNQEVMEHQGGYTPFEADVTPYVIAGKSVRI TVCVNNELNWQTIPPGMVIDDENGKKKQSYFHDFNYAGIHRVSVMLYTPNT
WVDDITVTVTHVAQDCNHASVDWQVVANGDVSVELRDADQQVATGQGTSGTLQVVNPHLWQPGEGYLYELCVTAKSQTECDIYPLRVGIRS
VAVKGGQFLINHKKPFYFTGFRHEDADLRGKGFNDVLMVHDHALMDWIGANSYRTSHYPYAEEMLDWADEHGIVVIDETAAVGFNLSLGIG
FEAGNKPKEYLSEEAVNGETQQAHLQAIKELIARDKNHPSVVMWSIANEPDTRPQVHGNISPLAEATRKLDPTRPITCVNVMFCDAHTDTI
SDLFDVLCNRYYGWYVQSGDLETAEKVLEKELLAWQEKLHQPIIITEYGVDTLAGLHSMYTDMMWSEEYQCAWLDMYHRVFDVSAVVGEO
VWNFAADFATSQGILRVGGNKKGIFTRDRKPKSAAFLLQKRWTGMNFGEKPPQGGKQ

Región reguladora **4124..4701** (578pb) - terminador

/note = Ter GmVspB

Complemento **(4714..4748)** 34 pb

/note= "loxP1" sitio complementario reconocido por la Cre recombinasa.

Región reguladora **4762..5004** (243 pb) – clase de regulador "promotor"

/note= "G10-90 promoter"

CDS **5020..6585** (1566 pb)

/producto=" XVE"

Id de proteína= "AAK08505.1"

/Traducción=

"MKALTARQQEVFDLIRDHISQTMPPTRAEIAQRLGFRSPNAAEEHLKALARKGVIEIVSGASRGIRLLQEEEEGLPLVGRVAAGEPSSAP
PTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDSPGPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMFDTALGIDEYGGDPSAGDMRAANLWPS
PLMIKRSKKNLALSALTADQMVSAALLDAEPPILYSEYDPTRFSEASMMGLLTNLDRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLLECAWLE
ILMIGLVWRSMHEPVKLLFAPNLLDRNQKCVEGMVEIFDMLLATSSRFMMNLQGEFVCLKSI ILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIH
RVLDKITDTLHLMAGLTLQQQHQLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMCKKNVPLYDLLEMLDAHRLHAPTSRGGASVEETDQSH
LATAGSTSSHSLQKYYITGEAEGFP ATV-ELPGEFPEMLAEIITNQIPKYSNGNIKKLLFHQK-LDL"

Región reguladora **6611..6905** (295 pb) – tipo de regulador "terminador"

/note= "TerPeaRbsC"

Región reguladora **6948..7867** (920 pb) – tipo de regulador “promotor”

/note= “StUbi promoter”

CDS **7896..8921** (1026 pb)

/producto= “hph”

Id de proteína=

/traducción= “MKKPELTATSVEKFLIEKFDSVSDLMQLSEGEESRAFSFDVGGRGYVLRVNSCADGFYKDRYVYRHFASAALPIPEVL
DIGAFSESLTYCISRRAGVTLQDLPETELPAVLQPVAEAMDAIAAADLSQTSFGFGPFGPQGIGQYTTWRDFICAIADPHVYHWQTMDDT
VSASVAQALDELMLWAEDCPEVRHLVHADFGSNNVLTDNGRITAVIDWSEAMFGDSQYEVANIFFWRPWLACMEQQTRYFERRHPELAGSP
RLRAYMLRIGLDQLYQSLVDGNFDDAAWAQGRCDIVRSAGAGTVGRTQIARRSAAVWTDGCVEVLADSGNRRPSTRPRAKE”

Región reguladora **8962..9363** (402 pb) - tipo de regulador “promotor”

/note= “StUbi-3 ter”

Región reguladora **9392..9701**– tipo de regulador “operador fusionado a promotor”

/note= “LexA operator 35S prom”

CDS fragmentado (**9702..10133, 10304..10903**)

/producto= “cre”

Id de proteína= “[AAK08508.1](#)”

/traducción=

“MSNLLTVHQNLPALPVDATSDEVRKNLMDMFRDRQAFSEHTWKMLLSVCRSAAWCKLNNRKFPAEPEDVRDYLLYLQARGLAVKTIQQH
LGQLNMLHRRSGLPRPSDSNAVSLVMRRIRKENVDAGERAKQALAFERTDFDQVRSMLMENSQRCDIRNLAFGLGIAYNTLLRIAETARIRV
KDISRTDGGRLIHIHGRKTLVSTAGVEKALS LGVTKLVERWISVSGVADDPNNYLFRCVRKNGVAAPSATSQLSTRALEGI FEATHRLIY
GAKDDSGQRYLAWSGHSARVGAARDMARAGVSIPEIMQAGGWTNVNIVMNYIRNLDSETGAMVRLLEDGD”

Intrón **10134..10303**

/note= intrón “Arabidopsis KOR1 gene”

Región reguladora **10904..11156** (253 pb) – tipo de regulador “terminador”

/note= “TNos”

Complemento **11157..11193** (37 pb)

/note= “loxP2”

Vector binario base **11200..17889** (6680 pb) – fragmento proveniente del vector binario **pUB desarmado** con sitios *AfeI*

Complemento **11303..11327** (25 pb)

/note = "LB"

Complemento

17808..17829 (22 pb)

/note = "RB"

Secuencia completa del vector pSBin-pGmUbi

GGGCaaGCGGCCGCaaGGTACCaGGGGTTTATTTATATAGGAAACCAAGCATAAAAATCTGGTCAAGGAGTCTTAAAAGTCTGACACGTGC
TGCGTGGCGTTGAGGATGTAGCTGCCACGTGCATGGACACGTGTTGGTTTCCTTTTTAGTGAAACCGTGCATCGCTTTCTGATTCATGGC
TTGACACGTGTGGACTCTATCCAAAATTTGGATAAGTGTTTAGCTAGCTGGGCCATGGATGGATGTGAATTTAAGCGGTGTACCGACTCT
GGATTTTGTGTGACATCTGTGACAATTTGACAAAGATACAAGAACCCCGAATTAGTCCAAAAAAGTTTAGTGCCAAACATGTTAAATTT
TGATCATTGTATTTGCACAATCTTTAGCATGCACATAGCAGAACAAGTGAACAACCAATATAATTTATATCAGTAATCTTGAATCTTTAT
CAAAAATATTTTACGCTGAGTATAACGTTTACAAACACAGCTAATTAAGTTTTGGAAATATATTTAAATAAATTTGAATCTATGATATTGT
AAAATAATAGTAAAACCTTATATTAGCACAACTATAAACCTTCCATATAGCCTTGGAAATTTGGCACCACGGATAACGGTAGACTAATGAAA
CGGACTACTTGATCTAACTGGGGTTGAGCTGATCCTAACCAAGAGAGTGTATTTATTGGCTGAAATTTGTGTTATGAGTAGGGTAGGTAT
TACTTTTTGCACCCGCTTTTTACTTATACATTTTTCTTTATTTTTTTTTTGTATTTTATTTTAAAAATATTTATTTTTTCAAGACTAATTC
AGAAGTTCATTTTTACAACATAACTTTTTCAAATTTATTTTTTAAATGAAATAATTTGTTCGAAAGCTAAAATTTGAAAGTGTAAA
ATTTTTAATACTTTTAAAAATAAATTATAAAAAGAAGGCTTCCCACGTTTTTATTTTAGTGATGGCTGTTAACTTAAAGAAGGGATTGTGT
GGGGTATTTGGTTTGCATGAATCAATATGTTTTTAAAAATAGAAAATTAGATTGTAGTCAGGTGCTTAAACAACGTTTAACTCAAAT
GTTATCACCTAATCTGAATAGTCAAGTTTATGTTGAATCATATGAGGTGATAATATGGAAGAAGTCCCGGATGATCTTCATAAAAATCAAT
TTCATACTGCAATTAGAAAAGGATAGAGAAGTGAATTGGATTTAATTGTCCGTGATGTTCAAGGAAATGTCTAGCTTCGCCACACAATAT
TTTTATAGTTTATTATTAGTAATAGATGGGGAATAAAATTTGCTCACAAATTTAGCTGCTTTGTCTTTTACCTATTTAGGTAATTGCTTTAT
TGAGGAAGTCTCCTACAAGTTGGATCAAATCATTGCATATTATGTATCTCTAGTGCCGTCAAAATGGGTTCTAGTTTGTGGGTGAGCCCGA
TCCATTGTGAAGTGAAGGTGAGTCAAGTTTAAATTTTTTTTAAATTCAGTATTGATAACTTTTCAGTCCGGCCACTTAACTGTGGGTAGG
TGGGCTCAATCCGTGGGTGTTGGTGGGTCAGactcgagatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccacctggtcgagc
tggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctg
caccaccggaagctgcccgtgcccgtgcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgagctgctcagccgctaccccgaccacatg
aagcagcagcacttcttcaagtcgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacc
gcgcccaggtgaagttcgaggcgacacccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggca
caagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccac
aacatcgaggacggcagcgtgagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcgccgacggccccgtgctgctgcccgaacaccat
acctgagcaccagctccgcccctgagcaaaagaccccacagagaagcgcgatcacatggtcctgctgagttcgtgaccgcccgggacac
tctcggcatggagcagcgtgtacaagcccggcagttacgtcctgtagaaaaccccacccgtaaatcaaaaaactcgacggcctggtggca
ttcagctctgtagcgaaaaactgtggaattgatcagcgttgggtgggaaaagcgcgttacaagaaagccgggcaattgctgtgccaggcagtt
ttaacgatcagttcgccgatgcagatattcgtaattatgcgggcaacgtctggtatcagcgcgaagctcttataccgaaaggttgggcagg
ccagcgtatcgtgctgctgttccgatgcccgtcactcattacggcaaaagtggtcaataatcaggaagtgatggagcatcagggcggctat
acgccatttgaagccgatgtcagcccgtatggtattgcccgggaaaagtgatcgtatcaccggttgggtgaaacaagcgaactgaactggcaga
ctatcccgcgggaatggtgattaccgacgaaaacggcaagaaaagcagcttacttccatgatttctttaaactatgcccgaatccatcg
cagcgtaatgctctacaccacgcccgaacacctgggtgagcagatcaccggtgagcagatgctcgcgcaagactgtaaccacgcgtctgtt
gactggcaggtggtggccaatggtgatgtcagcgttgaactgctgagcggatcaacaggtggttgcaactggacaagcactagcggga
ctttgcaagtggtgaatccgcacctctggcaaccgggtgaaggttatctctatgaactgtgctcacagccaaaagccagacagagtgatga
tatctaccgcttccgctcgccatccggtcagtggtgagtggaagggcaacagttcctgattaaccacaaaaccggttctactttactggcttt
ggtcgtcatgaagatgcccacttacgctggcaaggtatcgataacgtgctgatggtgacagaccacgcattaatggactggattggggcca
actcctaccgtacctcgattacccttacgctgaagagatgctcagctggtgagatgaacatggcatcgtggtgattgatgaaactgctgc
tgtcggctttaaactctctttaggcattggttccgaagcgggcaacaagccgaaagaactgtacagcgaagagggcagtcacaggggaaact
cagcaagcgcacttacaggcgattaaagagctgatagcgtgacaaaaaccacccaagcgtggtgatgtggagtttccaacgaaccgg
ataccgctccgcaagtgacgggaatatttccgactggcgggaagcaacgcgtaaactcgaccgacgctccgatcacctgctcaatgt
aatggttctgcgacgctcacaccgataccatcagcgtatctcttggatgtgctgctgacccgttattacggatggtatgtccaaagcggc
gatttggaaacggcagagaaggtactggaaaaagaacttctggcctggcaggagaaactgcatcagccgattatcatcaccgaatacggcg
tggatacgttagccgggctgactcaatgtacaccgacatgtggagtgaaagatcagtgctgcatggctggatgtatcaccgctctt
tgatcgcgtcagcggcctgctcgggtgaacaggtatggaatttccgcatcttgcgacctcgcaaggcatattgcccgttggcggtaacaag
aaagggatcttactcgcgaccgcaaacggaagtcggcggtcttctgctgcaaaaacgctggactggatgaactcgggtgaaaaaccgc
agcagggaggcaacaatgaGGCGCGCctaccttcacctctctcaacaatctagctagagtttgcctctctatataatgtaataaggtatgc
tgatattgactattcaaataggagcattagctatggttggtaatgtcactttatggtatgtgggtaagtcacctaagacactccacgtacc
tacggttgtgctcttaccggcttataaaatcttctgccttggttccatatttactaattatcccttcttcaactaaaagaaaattgta

tcattaagatttagtctttagaacatatgaggtctttaattgggttaggttttacaataactaatataaaaatgtcataaaatccacgtgg
ttaacaaatgcagaaaatcgacgtcgtctattggaccgacagttgctatataatataatgggccaccatagtagactgacaaaataatc
ctgacaacatcgtttactaaataacaaacacaaaaagggagtgcatTTTTCCAGGGCATTTTTGTAATAAAAAACAGTTAAAGGGAGTGC
aatagaaataggggtgtggaatagtgatttgagcagctctgaagcaaatgggttgTCTGCCCTAATCATAaacttcgtatagcatac
attatacgaagttagAGCGCTaacactgatagtttaactgaaggcgggaaacgacaatctgatccaagctcaagctaaagcttgcatgcc
tgcaggatctggtgacccaagcttgccacgtgcccacgtgcccacgtgcccacgtgcccacgtgcccacgtgcccacgtgcccacgtgccc
aagggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagaccctcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgtgggatccc
caattccgggcggaatgaaagcgttaacggtccaggcaacaagaggtggttgatctcatccgtgatcacatcagccagacaggtatgccc
gacgctgcccgaatcgcgacgctttgggttccgttccccaaacgcgctgaagaacatctgaaggcgtggcagcgaaggcgttatt
gaaattgttccggcgcatcacgctgggttctgctgttgaggaagaggaagaagggttgcgctggtaggtcgtgtggctgcccgtgaa
cgtcgagcgcgggggacagctgctcagcctgggggacgagctccacttagacggcgaggacgtggcgatggcgcatgcccagcgcgtaga
cgatttgcgactgagcagctgtgggggacgggattccccgggtccgggatttccccccacgactccgcccctacggcgtctggatag
gcccacttcgagtttgagcagatgtttaccgatgcccttgaattgacgagtagcgtggggatccgctctgctggagacatgagagctgcca
acctttggccaagcccgtcatgatcaaacgctctaagaagaacagcctggccttgcctgacggccgaccagatggtcagtgccctgtt
ggatgctgagccccatactctattccgagtagatgatcctaccagacccttcagtgaaagcttcgatgatgggcttactgaccaacctggca
gacagggagctggttcacatgatcaactggcgaagaggggtgccaggcttctggatttgaccctccatgatcaggtccaccttctagaat
gtgctggctagagatcctgatgattggtctcgtctggcgtccatggagcaccagtgaaagctactgtttgcctcctaacttgcctctgga
caggaaacagggaaaatgtgtagagggcatgggtggagatcttcgacatgctgctggctacatcatcctggttccgcatgatgaatctgcag
ggagaggagtttgggtgctcctcaaatctatttttgcctaaactctgagtgtagacacatttctgctccagcaccctgaaagctctggaagaga
aggaccatctccaccgagctcctggacaagatcacagacactttgatccactgatggccaagggcagcctgaccctgacgagcagcaca
gcggtgcccagctcctcctcatcctctccacatcagccacatgagtaacaaaggcatggagcatctgtacagcatgaaagtgaagaac
gtggtgcccctctatgacctgctgctggagatgctggacgcccaccgctacatgcccactagcctggaggggcatccgtggaggaga
cggaccaaagccacttggccactgcccgtctacttcatcgacttcttgcaaaagtattacatcacgggggagggcagaggggttccctgc
cacagtctgagagctccctggcgaattcccagagatgttagctgaaatcactaatacagataccaaaatattcaaatggaaatatcaa
aagcttctgttccatcaaaaatgactcgacctaactgagtaagctagctgttccgagtagtatggcattgggaaaactgttttcttctgac
catttgggtgcttgaatttactgtgtttttattcgttttccgctatcgaactgtgaaatggaaatggatggagaagagttaatgaatg
atatggtcctttgttcttctcaaatataattatttgttttctcttatttgttgtgtgtgaaattgaaattataagagatagcaa
acatttgttttgagtaaaaatgtgtcaaatcgtggcctctaatagaccgaagttaatatgaggagtaaaaacatccccaaacagcttgaaa
ctgaaggcgggaaACTAGTgggcagatcgatccaaagcacatacttatcgatttaaatttcatcgaagagattaatatcgaataatcatal
acatacttaataacatacaaaatTTAAATACATATACTGGTATATAATTAATTTTTAAAGTCAAGTATGATCAAAATACACATA
tggaaaaaatTAactattcataatTTAAATAAGATAACATCTAGTGAATAGGTGCATGTACAAATACATTAGGAAAAGGGCA
TATCTTGTCTAGATAAATTAACGATTTGATTTATGTATAATTTCAAATGAAGTTTATATCTACTCAGAAATAACAATACTTTT
ATCAGAACATTAACAAAGCAACAACCACTAGAGTGAAAAATACACATTTGTTCTCTAGACATACAAAATTGAGAAAAGAACTCAAAAT
TAGAGAAACAAATCTGAATTTCTAGAAGAAAAATAATTATGCACTTTGCTATTGCTCGAAAAATAATGAAAGAAATTAGACTTTTTTA
AAAGATGTTAGACTAGATAACTCAAAAGCTATTAAGGAGTAATATTCTCTTACATTAAGTATTTTAGTTACAGTCTGTAAATTAAGA
CACATTTTAGATTGTATCTAAACTTAAATGTATCTAGAATACATATAATTGAATGCATCATATACATGTATCCGACACACCAATTTCTATA
AAAACGTAATCTCTAACTAATTTATCCTCAAGTCAACTTAAGCCCAATATACATTTTCTCTAAAGGCCAAGTGGCACAAAATG
TCAGGCCAATTACGAAGAAAAGGGCTGTAAAACCCTAATAAAGTGGCACTGGCAGAGCTTACACTCTATTCCATCAACAAAGAAACC
TAAAAGCCGACGCGCACTGATTTCTCTCTCCAGGCGAAGGATCTCGACTCTAGGGGGCAATAAGATGAAAAAGCCTGAACCTACC
CGACTCTGTGAGAAGTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGTCTTCCAG
CTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGCTCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTGTCA
TCGGCCGCTCCCGATCCGGAAGTGTGACATTTGGGCATTGAGCAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCGCGGTGCACAGGGGTGCA
CGTTGCAAGCCTGCTGAAACCGAAGTGCCTGCTGTCAGCCGGTCCGGAGGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCGGATCTTAGCCA
GACGAGCGGTTTCGGCCATTCGGACCGCAAGGAATCGTCAATACACTACATGGCGTGTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTG
TACTACTGGCAAACGTGTGAGGACGACCCGTCAGTGCCTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTGGGCGAGGACTGCCCG
AAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCCGGCTCCAACAATGCTCTGACGGACAATGGCCGATAACAGCGGTCATTGACTGGAGCGAGGC
GATGTTCCGGGATTTCCCAATACGAGGTCCGCAACATCTCTCTGAGGCGGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGCGCTACTTCGAG
CGGAGGCATCCGGAGCTTGACGATCGCCGCGCTCCGGCGTATATGCTCCGATTTGGCTTGTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACG
GCAATTTGATGATGCAGCTTGGGCGAGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGACTGTCCGGCGTACACAAATCGCCG
CAGAAGCGCGGCTGTCGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCAGCGCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAA
TAGAGTAGATGCCGACCGGATCAATTCGGCTGATCCAAATTTGATTTAATGTTTAGCAAATGTCTTATCAGTTTTCTTTTTGTCTG
AACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGTCTATATGGATTTCTGTTTTGATGTATGTGACAACCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAACTAAG
AGTTTTGTCTTATTGTTCTGCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACT
AGCAATTTGGCTGCGAGCTATGGATTAAGAACTATCAAGTCTGTGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTTATCA
TGTCTTATGCTCATTCCCTTGAGTATAATATAGTAAAAAATAGTAAATTAAGCAATAATGTTAGGTGCTATGTCTGTGCGAGACTAT
TGGGGTAGCTTAATTAACTGTACATATAACCCTGTTTTATATACAGCAGTACTGTACATATAACCCTGTTTTATATACAGCAGTCTC
GAGTACTGTACATATAACCCTGTTTTATATACAGCAGTACTGTACATATAACCCTGTTTTATATACAGCAGTCTGAGGTAAGATTAG
ATATGGATATGTATATGGATATGTATATGGTGGTAATGCCATGTAATATGCTCGACTCTAGGATCTTCGCAAGACCCTCCTCTATATAAG
GAAGTTCAATTTCAATTTGGAGAGGACGCTGAAGCTAGTCTGACTCTAGCCTCGACATGTCCAATTTACTGACCGTACACCAAAATTTGCT

CGACAGACGAAAACGGCCACGTCCATGATGCTGCGACTATCGCGGGTGCCACGTCATAGAGCATCGGAACGAAAAATCTGGTTGCTCG
TCGCCCTTGGGCGGCTTCC TAATCGACGGCGCACCGGCTGCCGGCGGTTGCCGGGATTCTTTGCGGATTGATCAGCGGGCCGCTTGCCACG
ATTCACCGGGGGCGTGCTTCTGCCTCGATGCGTTGCCGCTGGGCGGCTTCAACTTCTCCACCAGGTATCACCCAGCGCCGC
GCCGATTTGTACCGGGCCGGATGGTTTGCACCGTACGCGGATTCCCTCGGGCTTGGGGGTTCCAGTGCCATTGCAGGGCCGGCAGACAAC
CCAGCCGCTTACGCCTGGCCAACCGCCCGTTCCTCCACACATGGGGCATTCCACGGCGTCGGTGCCTGGTTGTTCTTGATTTTCCATGCCG
CCTCCTTTAGCCGCTAAAATTCATCTACTCATTTATTTCATTTGCTCATTTACTCTGGTAGCTGCGCGATGATTCAGATAGCAGCTCGGTA
ATGGTCTTGCCCTGGCGTACCGCGTACATCTTCAGCTTGGTGTGATCCTCCGCCGGCAACTGAAAAGTTGACCCGCTTTCATGGCTGGCGTGT
CTGCCAGGCTGGCCAACGTTGCAGCCTTGTGCTGCGTGCCTCGGACGGCCGGCAGCTTAGCGTGTGTTGCTTTTGTCTCATTTTCTCTTT
ACCTCATTAACCTCAAATGAGTTTTGATTTAATTTTACGCGCCAGCGCCTGGACCTCGCGGGCAGCGTCCGCTCGGGTTCTGATTCAAGAA
CGGTTGTGCCGGCGGGCAGTGCCTGGGTAGCTCACGCGCTGCGTGATACGGGACTCAAGAATGGGCAGCTCGTACCCGGCCAGCGCCTC
GGCAACCTCACCGCGATGCGCGTGCCTTTGATCGCCCGGACACGACAAAAGGCCGCTTGTAGCCTTCCATCCGTGACCTCAATGCGCTGC
TTAACCAGCTCCACCAGGTGCGGGTGGCCATATGTCGTAAGGGCTTGGCTGCACCGGAATCAGCACGAAGTCGGCTGCCTTGATCGCGG
ACACAGCCAAGTCCGCCGCTGGGGCGCTCCGTGATCACTACGAAGTCGCGCCGGCCGATGGCCTTACGTCGCGGTCAATCGTCGGGG
GTGATGCCGACAACGTTAGCGGTTGATCTTCCCGCACGGCCGCCAATCGCGGGCAGTGCCTTGGGATCGGAATCGACTAACAGAACA
TCGGCCCCGGCGAGTTGCAGGGCGCGGGCTAGATGGGTTGCGATGGTCTGCTTGCCTGACCCGCTTTTCTGGTTAAGTACAGCGATAACCT
TCATGCGTTCCCCTTGCCTATTTGTTTATTACTCATCGCATCATATACGCGAGCGACCGCATGACGCAAGCTGTTTTACTCAAATACACAT
CACTTTTTTAGACGGCGCGCTCGGTTTTCTCAGCGGCCAAGCTGGCCGGCCAGGCCCGCAGCTTGGCATCAGACAAAACCGGCCAGGATTT
CATGCAGCCGCACGGTTGAGACGTGCGCGGGCGGCTCGAACACGTACCCGGCCGCGATCATCTCCGCCTCGATCTCTTCGGTAATGAAAA
CGGTTGCTCCTGGCCGCTTGGTGCCTTTCATGCTTGTCCCTCTTGGCGTTTCAATCTCGGCGGCCCGCCAGGGCGTCGGCCTCGGTCAATG
CGTCTCACGAAGGCACCGCGCCGCTGGCCTCGGTGGGCGTCACTTCTCGCTGCGCTCAAGTGC CGGTACAGGGTCGAGCGATGCAC
GCCAAGCAGTGCAGCCGCTCTTTACGGTGC GGCTTCTGTTGTCGATCAGCTCGCGGGCGTGC GCGATCTGTGCCGGGGTGAGGGTAGGG
CGGGGGCCAAACTTCACGCCTCGGGCTTGGCGGCTCGCGCCGCTCCGGGTGCGGTGATGATTAGGGAAAGCTCGAACTCGGCAATGC
CGGCGAACACGGTCAACACCATGCGGCCGGCCGGCGTGGTGGTGTGCGCCACGGCTCTGCCAGGCTACG CAGGCCCGCCGGCCTCCTG
GATGCGCTCGGCAATGTCCAGTAGGTGCGGGTGTGCGGGCCAGGCGGTCTAGCCTGGTCACTGTCACAACGTCGCCAGGGCGTAGGTGG
TCAAGCATCTGGCCAGCTCCGGGCGGTGCGCCTGGTGC CGGTGATCTTCTCGAAAAACAGCTTGGTGCAGCCGGCCGCTG CAGTTCCG
CCCGTTGGTTGGTCAAGTCTGGTGCCTGCTGACGCGGGCATAGCCAGCAGGCCAGCGGGCGGCTCTTGTTCATGGCGTAATGCTCT
CCGTTCTAGTCGCAAGTATTCTACTTTATGCGACTAAAACACGCGACAAGAAAACGCCAGGAAAAGGGCAGGGCGGCAGCCTGTGCGGTA
ACTTAGGACTTGTGCGACATGTCGTTTTT CAGAAGACGGCTGCACTGAACGTCAGAAGCCGACTGCACTATAGCAGCGGAGGGGTTGGATCA
AAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTGATCCCAGGGGAACCCTGTGGTTGGCATGCACATACAAATGGACGAACGGA
TAAACCTTTTCACGCCCTTTTAAATATCCGTTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACACTG
ATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAACTCTGATCCAAGCTCAAGCTGCCTCagc

14 Referencias bibliográficas

- [1] A. L. Ososki and E. J. Kennelly, "Phytoestrogens: a review of the present state of research," *Phyther. Res.*, vol. 17, no. 8, pp. 845–869, Sep. 2003.
- [2] T. Sakai and M. Kogiso, "Soy isoflavones and immunity.," *J. Med. Invest.*, vol. 55, no. 3–4, pp. 167–73, Aug. 2008.
- [3] M. Friedman and D. L. Brandon, "Nutritional and health benefits of soy proteins," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 3, pp. 1069–1086, 2001.
- [4] D. Pimentel and T. Patzek, "Ethanol Production Using Corn, Switchgrass and Wood; Biodiesel Production Using Soybean," in *Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2008, pp. 373–394.
- [5] R. H. Burris and G. P. Roberts, "Biological Nitrogen Fixation," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 13, no. 1, pp. 317–335, Jul. 1993.
- [6] *FAO Statistical Pocketbook 2015 World Food and Agriculture*. 2015.
- [7] P. D. Goldsmith, "Economics of Soybean Production, Marketing, and Utilization," *Soybeans Chem. Prod. Process. Util.*, pp. 117–150, 2008.
- [8] T. Shaheen, M.- Rahman, M. Shahid Riaz, Y. Zafar, and M.- Rahman, "Soybean production and drought stress," *Abiotic Biot. Stress. Soybean Prod.*, pp. 177–196, Jan. 2016.
- [9] "FAOSTAT." [Online]. Available: <http://www.fao.org/faostat/>. [Accessed: 15-Feb-2019].
- [10] M. A. Hossain, S. H. Wani, S. Bhattacharjee, D. J. Burritt, and L. S. P. Tran, "Drought stress tolerance in plants, vol 2: Molecular and genetic perspectives," *Drought Stress Toler. Plants, Vol 2 Mol. Genet. Perspect.*, pp. 1–587, Jan. 2016.
- [11] R. Serraj, T. R. Sinclair, and L. C. Purcell, "Symbiotic N₂ fixation response to drought," *J. Exp. Bot.*, vol. 50, no. 331, pp. 143–155, Feb. 1999.
- [12] H. Zhang and U. Sonnewald, "Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses," *Plant J.*, vol. 90, no. 5, pp. 839–855, Jun. 2017.
- [13] K. S. Rucker, C. K. Kvien, C. C. Holbrook, and J. E. Hook, "Identification of Peanut Genotypes with Improved Drought Avoidance Traits," *Peanut Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 14–18, Jan. 1995.
- [14] S. Fahad *et al.*, "Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options," *Frontiers in Plant Science*, vol. 8. Frontiers Media S.A., p. 1147, 29-Jun-2017.
- [15] T. J. Zhao *et al.*, "Regulating the drought-responsive element (DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in *Brassica napus*," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 16, pp. 10752–10759, Apr. 2006.
- [16] J. Leung and J. Giraudat, "Abscisic acid signal transduction," *Annu. Rev. Plant Biol.*,

vol. 49, pp. 199–222, 1998.

- [17] C. D. Rock, “Tansley review no. 120: Pathways to abscisic acid-regulated gene expression,” *New Phytologist*, vol. 148, no. 3. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 357–396, 01-Dec-2000.
- [18] A. Rohde, S. Kurup, and M. Holdsworth, “ABI3 emerges from the seed,” *Trends in Plant Science*, vol. 5, no. 10. Elsevier Ltd, pp. 418–419, 2000.
- [19] P. K. Agarwal and B. Jha, “Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling,” *Biologia Plantarum*, vol. 54, no. 2. Springer, pp. 201–212, 15-Apr-2010.
- [20] I. M. Møller, P. E. Jensen, and A. Hansson, “Oxidative modifications to cellular components in plants,” *Annual Review of Plant Biology*, vol. 58. Annual Reviews Inc., pp. 459–481, 2007.
- [21] L. P. Manavalan, S. K. Guttikonda, L.-S. Phan Tran, and H. T. Nguyen, “Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean,” *Plant Cell Physiol.*, vol. 50, no. 7, pp. 1260–1276, Jul. 2009.
- [22] M. Vazquez-Hernandez, I. Romero, M. I. Escribano, C. Merodio, and M. T. Sanchez-Ballesta, “Deciphering the Role of CBF/DREB Transcription Factors and Dehydrins in Maintaining the Quality of Table Grapes cv. Autumn Royal Treated with High CO₂ Levels and Stored at 0°C,” *Front. Plant Sci.*, vol. 8, p. 1591, Sep. 2017.
- [23] D. W. Choi, B. Zhu, and T. J. Close, “The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: Sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo,” *Theor. Appl. Genet.*, vol. 98, no. 8, pp. 1234–1247, 1999.
- [24] M. Hundertmark and D. K. Hinch, “LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*,” *BMC Genomics*, vol. 9, no. 1, pp. 1–22, Mar. 2008.
- [25] J. Delahaie, M. Hundertmark, J. Bove, O. Leprince, H. Rogniaux, and J. Buitink, “LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance,” *J. Exp. Bot.*, vol. 64, no. 14, pp. 4559–4573, Nov. 2013.
- [26] W. E. Finch-Savage, S. K. Pramanik, and J. D. Bewley, “The expression of dehydrin proteins in desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of temperate trees,” *Planta*, vol. 193, no. 4, pp. 478–485, May 1994.
- [27] M. Hanin, F. Brini, C. Ebel, Y. Toda, S. Takeda, and K. Masmoudi, “Plant dehydrins and stress tolerance,” *Plant Signal. Behav.*, vol. 6, no. 10, pp. 1503–1509, Oct. 2011.
- [28] Y. Liu, Q. Song, D. Li, X. Yang, and D. Li, “Multifunctional Roles of Plant Dehydrins in Response to Environmental Stresses,” *Front. Plant Sci.*, vol. 8, p. 1018, Jun. 2017.
- [29] M. C. Koag, R. D. Fenton, S. Wilkens, and T. J. Close, “The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity,” *Plant Physiol.*, vol. 131, no. 1, pp.

309–316, Jan. 2003.

- [30] T. E. Carter *et al.*, “Registration of ‘N7103’ Soybean,” *Crop Sci.*, vol. 43, no. 3, pp. 1128–1128, May 2003.
- [31] R. J. Sloane, R. P. Patterson, and T. E. Carter, “Field Drought Tolerance of a Soybean Plant Introduction,” *Crop Sci.*, vol. 30, no. 1, pp. 118–123, Jan. 1990.
- [32] A. L. Fletcher, T. R. Sinclair, and L. H. Allen, “Transpiration responses to vapor pressure deficit in well watered ‘slow-wilting’ and commercial soybean,” *Environ. Exp. Bot.*, vol. 61, no. 2, pp. 145–151, Nov. 2007.
- [33] C. A. King, L. C. Purcell, and K. R. Brye, “Differential Wilting among Soybean Genotypes in Response to Water Deficit,” *Crop Sci.*, vol. 49, no. 1, pp. 290–298, Jan. 2009.
- [34] L. L. Ries, L. C. Purcell, T. E. Carter, J. T. Edwards, and C. A. King, “Physiological Traits Contributing to Differential Canopy Wilting in Soybean under Drought,” *Crop Sci.*, vol. 52, no. 1, pp. 272–281, Jan. 2012.
- [35] D. V. Charlson *et al.*, “Polygenic inheritance of canopy wilting in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.],” *Theor. Appl. Genet.*, vol. 119, no. 4, pp. 587–594, Aug. 2009.
- [36] J. H. Shin *et al.*, “Transcriptomic changes due to water deficit define a general soybean response and accession-specific pathways for drought avoidance,” *BMC Plant Biol.*, vol. 15, no. 1, Jan. 2015.
- [37] K. Kunert and B. J. Vorster, “In search for drought-tolerant soybean: is the slow-wilting phenotype more than just a curiosity?,” *J. Exp. Bot.*, vol. 71, no. 2, pp. 457–460, 2020.
- [38] P. Bhatnagar-Mathur, V. Vadez, and K. K. Sharma, “Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: Retrospect and prospects,” *Plant Cell Reports*, vol. 27, no. 3. *Plant Cell Rep*, pp. 411–424, Mar-2008.
- [39] M. S. Pathan, J. D. Lee, J. G. Shannon, and H. T. Nguyen, “Recent advances in breeding for drought and salt stress tolerance in soybean,” in *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, Springer Netherlands, 2007, pp. 739–773.
- [40] H. Abdel-Haleem, G. J. Lee, and R. H. Boerma, “Identification of QTL for increased fibrous roots in soybean,” *Theor. Appl. Genet.*, vol. 122, no. 5, pp. 935–946, Mar. 2011.
- [41] J. E. Specht *et al.*, “Soybean Response to Water: A QTL Analysis of Drought Tolerance,” *Crop Sci.*, vol. 41, no. 2, pp. 493–509, Mar. 2001.
- [42] MONTEROS and M. J., “Identification and confirmation of QTL conditioning drought tolerance in Nepalese soybean,” *11th Bienn. Conf. Mol. Cell. Biol. Soybean, August 5-8, Lincoln, NE, 2006*, 2006.
- [43] W. Du, M. Wang, S. Fu, and D. Yu, “Mapping QTLs for seed yield and drought susceptibility index in soybean (*Glycine max* L.) across different environments,” *J. Genet. Genomics*, vol. 36, no. 12, pp. 721–731, Dec. 2009.

- [44] H. Ye *et al.*, “The importance of slow canopy wilting in drought tolerance in soybean,” *J. Exp. Bot.*, vol. 71, no. 2, pp. 642–652, 2020.
- [45] C. Papdi, E. Ábrahám, M. P. Joseph, C. Popescu, C. Koncz, and L. Szabados, “Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system,” *Plant Physiol.*, vol. 147, no. 2, pp. 528–542, Jun. 2008.
- [46] P. R. Matthews *et al.*, “Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent ‘twin T-DNAs’ on a standard Agrobacterium transformation vector,” *Mol. Breed.*, vol. 7, no. 3, pp. 195–202, 2001.
- [47] R. Shoemaker *et al.*, “A compilation of soybean ESTs: Generation and analysis,” *Genome*, vol. 45, no. 2, pp. 329–338, 2002.
- [48] I. Y. Choi *et al.*, “A soybean transcript map: Gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis,” *Genetics*, vol. 176, no. 1, pp. 685–696, May 2007.
- [49] J. L. Cooper *et al.*, “TILLING to detect induced mutations in soybean,” *BMC Plant Biol.*, vol. 8, no. 1, p. 9, Jan. 2008.
- [50] F. G. González *et al.*, “An Interdisciplinary Approach to Study the Performance of Second-generation Genetically Modified Crops in Field Trials: A Case Study With Soybean and Wheat Carrying the Sunflower HaHB4 Transcription Factor,” *Front. Plant Sci.*, vol. 11, p. 178, Mar. 2020.
- [51] P. A. Manavella *et al.*, “Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor,” *Plant J.*, vol. 48, no. 1, pp. 125–137, Oct. 2006.
- [52] C. A. Dezar, G. M. Gago, D. H. González, and R. L. Chan, “Hahb-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to Arabidopsis thaliana plants,” *Transgenic Res.*, vol. 14, no. 4, pp. 429–440, Aug. 2005.
- [53] F. Gabriela González *et al.*, “Field-grown transgenic wheat expressing the sunflower gene HaHB4 significantly outyields the wild type,” *J. Exp. Bot.*, vol. 70, no. 5, pp. 1669–1681, 2019.
- [54] K. F. Ribichich *et al.*, “Successful field performance in warm and dry environments of soybean expressing the sunflower transcription factor HB4,” *J. Exp. Bot.*, vol. 71, no. 10, pp. 3142–3156, May 2020.
- [55] C. Lata and M. Prasad, “Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants,” *Journal of Experimental Botany*, vol. 62, no. 14. Oxford Academic, pp. 4731–4748, 01-Oct-2011.
- [56] S. J. Gilmour, D. G. Zarka, E. J. Stockinger, M. P. Salazar, J. M. Houghton, and M. F. Thomashow, “Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression,” *Plant J.*, vol. 16, no. 4, pp. 433–442, Nov. 1998.
- [57] K. R. Jaglo-Ottosen, S. J. Gilmour, D. G. Zarka, O. Schabenberger, and M. F.

- Thomashow, "Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance," *Science* (80-.), vol. 280, no. 5360, pp. 104–106, Apr. 1998.
- [58] Q. Liu *et al.*, "Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis," *Plant Cell*, vol. 10, no. 8, pp. 1391–1406, Aug. 1998.
- [59] M. Kasuga, S. Miura, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki, "A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer.," *Plant Cell Physiol.*, vol. 45, no. 3, pp. 346–50, Mar. 2004.
- [60] J. G. Dubouzet *et al.*, "OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression," *Plant J.*, vol. 33, no. 4, pp. 751–763, Feb. 2003.
- [61] S. J. Oh *et al.*, "Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth," *Plant Physiol.*, vol. 138, no. 1, pp. 341–351, 2005.
- [62] Y. Ito *et al.*, "Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice," *Plant Cell Physiol.*, vol. 47, no. 1, pp. 141–153, Jan. 2006.
- [63] A. Pellegrineschi *et al.*, "Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions," *Genome*, vol. 47, no. 3, pp. 493–500, Jun. 2004.
- [64] S. Q. Gao *et al.*, "A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat," *Plant Cell Rep.*, vol. 28, no. 2, pp. 301–311, Feb. 2009.
- [65] P. Bhatnagar-Mathur, K. K. Sharma, M. J. Devi, R. Serraj, K. Yamaguchi-Shinozaki, and V. Vadez, "Evaluation of transgenic groundnut lines under water limited conditions," 2004.
- [66] P. Bhatnagar-Mathur *et al.*, "Stress-inducible expression of at DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions," *Plant Cell Rep.*, vol. 26, no. 12, pp. 2071–2082, Dec. 2007.
- [67] V. Vadez, J. S. Rao, P. Bhatnagar-Mathur, and K. K. Sharma, "DREB1A promotes root development in deep soil layers and increases water extraction under water stress in groundnut," *Plant Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 45–52, Jan. 2013.
- [68] A. M. Polizel *et al.*, "Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drought tolerance," *Genet. Mol. Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 3641–3656, Oct. 2011.
- [69] Y. Sakuma, K. Maruyama, F. Qin, Y. Osakabe, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki, "Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression," *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A., vol. 103, no. 49, pp. 18822–18827, Dec. 2006.
- [70] F. Qin *et al.*, “Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L.,” *Plant J.*, vol. 50, no. 1, pp. 54–69, Apr. 2007.
- [71] C. Almoguera, P. Prieto-Dapena, J. Díaz-Martín, J. M. Espinosa, R. Carranco, and J. Jordano, “The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9,” *BMC Plant Biol.*, vol. 9, 2009.
- [72] A. Terashima and S. Takumi, “Allopolyploidization reduces alternative splicing efficiency for transcripts of the wheat DREB2 homolog, WDREB2,” *Genome*, vol. 52, no. 1, pp. 100–105, Jan. 2009.
- [73] L. Liu, K. Zhu, Y. Yang, J. Wu, F. Chen, and D. Yu, “Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*),” *J. Plant Res.*, vol. 121, no. 2, pp. 215–226, Mar. 2008.
- [74] J. Mizoi *et al.*, “GmDREB2A;2, a canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is posttranslationally regulated and mediates DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-dependent gene expression,” *Plant Physiol.*, vol. 161, no. 1, pp. 346–361, Jan. 2013.
- [75] C. Engels *et al.*, “Introduction of the rd29A:AtDREB2A ca gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration,” *Genet. Mol. Biol.*, vol. 36, no. 4, pp. 556–565, 2013.
- [76] M. Chen *et al.*, “GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006.
- [77] Q. Qi, “Effect of transgenic DREB3 drought resistant soybean on soil enzyme activity and soil functional microorganism,” Northeast Agricultural University, 2012.
- [78] F. Kobayashi, E. Maeta, A. Terashima, and S. Takumi, “Positive role of a wheat HvABI5 ortholog in abiotic stress response of seedlings,” *Physiol. Plant.*, vol. 134, no. 1, pp. 74–86, Sep. 2008.
- [79] S. ji Lee *et al.*, “DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity,” *Plant Physiol.*, vol. 153, no. 2, pp. 716–727, Jun. 2010.
- [80] M. Jakoby *et al.*, “bZIP transcription factors in Arabidopsis,” *Trends in Plant Science*, vol. 7, no. 3. Trends Plant Sci, pp. 106–111, 01-Mar-2002.
- [81] Y. Fujita *et al.*, “AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis,” *Plant Cell*, vol. 17, no. 12, pp. 3470–3488, Dec. 2005.
- [82] L. G. Guedes Corrêa, D. M. Riaño-Pachón, C. Guerra Schrago, R. Vicentini dos Santos, B. Mueller-Roeber, and M. Vincentz, “The role of bZIP transcription factors in

- green plant evolution: Adaptive features emerging from four founder genes,” *PLoS One*, vol. 3, no. 8, Aug. 2008.
- [83] T. Yoshida *et al.*, “AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation,” *Plant J.*, vol. 61, no. 4, pp. 672–685, Feb. 2010.
- [84] E. G. G. Barbosa *et al.*, “Overexpression of the ABA-Dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit,” *Plant Mol. Biol. Report.*, vol. 31, no. 3, pp. 719–730, Jun. 2013.
- [85] C. Jung *et al.*, “Overexpression of AtMYB44 Enhances Stomatal Closure to Confer Abiotic Stress Tolerance in Transgenic *Arabidopsis* 1[C][W][OA],” *Plant Physiol.*, vol. 146, pp. 623–635, 2008.
- [86] J. S. Seo *et al.*, “Expression of the *Arabidopsis* AtMYB44 gene confers drought/salt-stress tolerance in transgenic soybean,” *Mol. Breed.*, vol. 29, no. 3, pp. 601–608, Mar. 2012.
- [87] R.-G. Xue, B. Zhang, and H.-F. Xie, “Overexpression of a NTR1 in transgenic soybean confers tolerance to water stress,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 89, no. 2–3, pp. 177–183, Jul. 2007.
- [88] J. A. de Ronde, R. N. Laurie, T. Caetano, M. M. Greyling, and I. Kerepesi, “Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant,” *Euphytica*, vol. 138, no. 2, pp. 123–132, Jul. 2004.
- [89] Clive James, “Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011 - ISAAA Brief 43-2011 | ISAAA.org,” *The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)*, 2009. [Online]. Available: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/>. [Accessed: 12-Nov-2020].
- [90] M. W. Bauer, “Researching the public sphere of biotechnology,” 2002. [Online]. Available: <http://www.euophd.net/bibliographic-items/book-chapters/researching-public-sphere-biotechnology>. [Accessed: 12-Nov-2020].
- [91] J. Lassen, K. H. Madsen, and P. Sandøe, “Ethics and genetic engineering - Lessons to be learned from GM foods,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 24, no. 5. Springer Verlag, pp. 263–271, 01-Jan-2002.
- [92] M. Sticklen, “Transgenic, Cisgenic, Intragenic and Subgenic Crops,” *Adv. Crop Sci. Technol.*, vol. 3, no. 2, pp. 1–2, Apr. 2015.
- [93] C. M. Rommens, “All-native DNA transformation: A new approach to plant genetic engineering,” *Trends in Plant Science*, vol. 9, no. 9. Elsevier, pp. 457–464, 01-Sep-2004.
- [94] I. B. Holme, T. Wendt, and P. B. Holm, “Holme, I. B., Wendt, T., & Holm, P. B. (2013). Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, 395–407. <https://doi.org/10.1111/pbi.12055>Intragenesis and

- cisgenesis as alternatives to transgenic cro,” *Plant Biotechnol. J.*, pp. 395–407, 2013.
- [95] H. Puchta and F. Fauser, “Gene targeting in plants: 25 years later,” *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 57, no. 6–8, pp. 629–637, 2013.
- [96] Z. Feng *et al.*, “Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 12, pp. 4632–4637, Mar. 2014.
- [97] C. Pan *et al.*, “CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations,” *Sci. Rep.*, vol. 6, Apr. 2016.
- [98] N. Sun, Z. Abil, and H. Zhao, “Recent advances in targeted genome engineering in mammalian systems,” *Biotechnology Journal*, vol. 7, no. 9. Biotechnol J, pp. 1074–1087, Sep-2012.
- [99] K. Belhaj, A. Chaparro-Garcia, S. Kamoun, and V. Nekrasov, “Plant genome editing made easy: Targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system,” *Plant Methods*, vol. 9, no. 1. BioMed Central, p. 39, 11-Oct-2013.
- [100] Y. Wakita, M. Otani, K. Iba, and T. Shimada, “Co-integration, co-expression and co-segregation of an unlinked selectable marker gene and NtFAD3 gene in transgenic rice plants produced by particle bombardment,” *Genes Genet. Syst.*, vol. 73, no. 4, pp. 219–226, Aug. 1998.
- [101] M. Xu *et al.*, “Production of marker-free transgenic rice (*Oryza sativa* L.) with improved nutritive quality expressing AmA1,” *Iran. J. Biotechnol.*, vol. 15, no. 2, pp. 102–110, 2017.
- [102] R. K. Singh, L. Sharma, N. Bohra, S. Anandhan, E. Ruiz-May, and F. R. Quiroz-Figueroa, “Recent Developments in Generation of Marker-Free Transgenic Plants,” in *Advances in Plant Transgenics: Methods and Applications*, Springer Singapore, 2019, pp. 127–142.
- [103] R. Kunze, “The maize transposable element Activator (Ac),” *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 204. Springer Verlag, pp. 161–194, 1996.
- [104] T. Mikami *et al.*, “Transformation efficiency and transgene expression level in marker-free RDR6-knockdown transgenic tobacco plants,” *Plant Biotechnol. Rep.*, vol. 12, no. 6, pp. 389–397, Dec. 2018.
- [105] N. E. Mujjassim Scholar *et al.*, “Cisgenesis and intragenesis a new tool for conventional plant breeding: A review,” ~ 2485 ~ *J. Pharmacogn. Phytochem.*, vol. 8, no. 1, 2019.
- [106] E. Jacobsen and H. J. Schouten, “Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants,” *Trends in Biotechnology*, vol. 25, no. 5. Trends Biotechnol, pp. 219–223, May-2007.
- [107] B. Sauer and N. Henderson, “Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1 (genome rearrangement/herpesviruses/Cre-lox/metalothionein),” 1988.
- [108] M. A. McLellan, N. A. Rosenthal, and A. R. Pinto, “Cre- lox P-Mediated Recombination:

- General Principles and Experimental Considerations," *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, Mar. 2017.
- [109] A. Bala, A. Roy, A. Das, D. Chakraborti, and S. Das, "Development of selectable marker free, insect resistant, transgenic mustard (*Brassica juncea*) plants using Cre/lox mediated recombination," *BMC Biotechnol.*, vol. 13, no. 1, p. 88, Oct. 2013.
- [110] C. Sreekala, L. Wu, K. Gu, D. Wang, D. Tian, and Z. Yin, "Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system," *Plant Cell Rep.*, vol. 24, no. 2, pp. 86–94, May 2005.
- [111] W. Cuellar *et al.*, "Self-excision of the antibiotic resistance gene nptII using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato," *Plant Mol. Biol.*, vol. 62, no. 1–2, pp. 71–82, Sep. 2006.
- [112] Y. Zhang, H. Li, B. Ouyang, Y. Lu, and Z. Ye, "Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects," *Biotechnol. Lett.*, vol. 28, no. 16, pp. 1247–1253, Aug. 2006.
- [113] F. Guo, D. N. Gopaul, and G. D. Van Duyne, "Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse," *Nature*, vol. 389, no. 6646, pp. 40–46, 1997.
- [114] F. Guo, D. N. Gopaul, and G. D. Van Duyne, "Asymmetric DNA bending in the Cre-loxP site-specific recombination synapse," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 13, pp. 7143–7148, Jun. 1999.
- [115] L. Kopertekh and J. Schiem, "Elimination of Transgenic Sequences in Plants by Cre Gene Expression," in *Transgenic Plants - Advances and Limitations*, InTech, 2012.
- [116] J. Zuo, Q.-W. Niu, and N.-H. Chua, "An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants," *Plant J.*, vol. 24, no. 2, pp. 265–273, Oct. 2000.
- [117] E. M. Pardo *et al.*, "Drought Tolerance Screening Under Controlled Conditions Predicts Ranking of Water-Limited Yield of Field-Grown Soybean Genotypes," *J. Agron. Crop Sci.*, vol. 201, no. 2, pp. 95–104, Apr. 2015.
- [118] "EEAOC." [Online]. Available: <https://www.eeaoc.gob.ar/?articulo=munasqa-rr>. [Accessed: 14-Nov-2020].
- [119] C. D. Nickell, G. R. Noel, D. J. Thomas, and R. Waller, "Registration of 'Jack' Soybean," *Crop Sci.*, vol. 30, no. 6, pp. 1365–1365, Nov. 1990.
- [120] T. Murashige and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures," *Physiol. Plant.*, vol. 15, no. 3, pp. 473–497, Jul. 1962.
- [121] M. Holsters *et al.*, "The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58," *Plasmid*, vol. 3, no. 2, pp. 212–230, Mar. 1980.
- [122] J. P. Gallino Malcuori, "Identificación y caracterización funcional de genes de tolerancia a sequía en soja," Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias, 2013.

- [123] C. Grefen, N. Donald, K. Hashimoto, J. Kudla, K. Schumacher, and M. R. Blatt, "A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies," *Plant J.*, vol. 64, no. 2, pp. 355–365, Oct. 2010.
- [124] M. Joshi *et al.*, "Use of green fluorescent protein as a non-destructive marker for peanut genetic transformation," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant*, vol. 41, no. 4, pp. 437–445, Jul. 2005.
- [125] H. Inoue, H. Nojima, and H. Okayama, "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids," *Gene*, vol. 96, no. 1, pp. 23–28, Jan. 1990.
- [126] A. A. Wise, Z. Liu, and A. N. Binns, "Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*," *Methods Mol. Biol.*, vol. 343, pp. 43–53, 2006.
- [127] Qiagen, "QIAquick Gel Extraction Kit Protocol," 2001.
- [128] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, "Molecular cloning: a laboratory manual.," *Mol. cloning a Lab. manual.*, no. Ed. 2, 1989.
- [129] J. J. Finer and A. Nagasawa, "Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.)," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 15, no. 2, pp. 125–136, 1988.
- [130] V. M. Samoylov, D. M. Tucker, and W. A. Parrott, "Soybean [*Glycine max* (L.) merrill] embryogenic cultures: The role of sucrose and total nitrogen content on proliferation," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant*, vol. 34, no. 1, pp. 8–13, Jan. 1998.
- [131] R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan, "GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.," *EMBO J.*, vol. 6, no. 13, pp. 3901–7, Dec. 1987.
- [132] J. T. Odell, F. Nagy, and N. H. Chua, "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter," *Nature*, vol. 313, no. 6005, pp. 810–812, 1985.
- [133] M. J. Battraw and T. C. Hall, "Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants," *Plant Mol. Biol.*, vol. 15, no. 4, pp. 527–538, Oct. 1990.
- [134] P. N. Benfey, L. Ren, and N.-H. Chua, "Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains," 1990.
- [135] S. C. Amack and M. S. Antunes, "CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology," *Current Plant Biology*, vol. 24. Elsevier B.V., p. 100179, 01-Dec-2020.
- [136] O. Mittelsten Scheid, A. V. Probst, K. Afsar, and J. Paszkowski, "Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 21, pp. 13659–13662, Oct. 2002.
- [137] A. Klöti, X. He, I. Potrykus, T. Hohn, and J. Fütterer, "Tissue-specific silencing of a transgene in rice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 16, pp. 10881–10886,

Aug. 2002.

- [138] P. GUPTA, S. RAGHUVANSHI, and A. K TYAGI, "Assessment of the Efficiency of Various Gene Promoters via Biolistics in Leaf and Regenerating Seed Callus of Millets, *Eleusine coracana* and *Echinochloa crusgalli*," *Plant Biotechnol.*, vol. 18, no. 4, pp. 275–282, 2001.
- [139] O. P. Dhankher *et al.*, "Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression," *Nat. Biotechnol.*, vol. 20, no. 11, pp. 1140–1145, 2002.
- [140] J. Manuel Zamudio-Arroyo, M. Teresa Peña-Rangel, J. Rafael Riesgo-Escovar María Teresa Peña-Rangel, and J. Rafael Riesgo-Escovar, "La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos," *TIP. Rev. Espec. en ciencias químico-biológicas*, vol. 15, no. 2, pp. 133–141, 2012.
- [141] A. von Mikecz, "The nuclear ubiquitin-proteasome system," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 10, pp. 1977–1984, May 2006.
- [142] P. Kawalleck, I. E. Somssich, M. Feldbrtlgge, K. Hahlbrock, and B. Weisshaar, "Polyubiquitin gene expression and structural properties of the *ubi4-2* gene in *Petroselinum crispum*," 1993.
- [143] A. H. Christensen, R. A. Sharrock, and P. H. Quail, "Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation," *Plant Mol. Biol.*, vol. 18, no. 4, pp. 675–689, Feb. 1992.
- [144] M. J. Cornejo, D. Luth, K. M. Blankenship, O. D. Anderson, and A. E. Blechl, "Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice," *Plant Mol. Biol.*, vol. 23, no. 3, pp. 567–581, Nov. 1993.
- [145] J. T. Weeks, O. D. Anderson, and A. E. Blechl, "Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*)," *Plant Physiol.*, vol. 102, no. 4, pp. 1077–1084, Aug. 1993.
- [146] B. Plesse, M. C. Criqui, A. Durr, Y. Parmentier, J. Fleck, and P. Genschik, "Effects of the polyubiquitin gene *Ubi. U4* leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum*," *Plant Mol. Biol.*, vol. 45, no. 6, pp. 655–67, Apr. 2001.
- [147] J. Callis, M. Fromm, and V. Walbot, "Introns increase gene expression in cultured maize cells," *Genes Dev.*, vol. 1, no. 10, pp. 1183–200, Dec. 1987.
- [148] A. H. Christensen, R. A. Sharrock, and P. H. Quail, "Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation," *Plant Mol. Biol.*, vol. 18, no. 4, pp. 675–89, Feb. 1992.
- [149] J. E. Garbarino, T. Oosumi, and W. R. Belknap, "Isolation of a polyubiquitin promoter and its expression in transgenic potato plants," *Plant Physiol.*, vol. 109, no. 4, pp. 1371–8, Dec. 1995.

- [150] I. K. Rollfinke, M. V Silber, and U. M. Pfitzner, "Characterization and expression of a heptaubiquitin gene from tomato.," *Gene*, vol. 211, no. 2, pp. 267–76, May 1998.
- [151] J. Wang and J. H. Oard, "Rice ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems," *Plant Cell Rep.*, vol. 22, no. 2, pp. 129–134, Sep. 2003.
- [152] J. M. Chiera AE Robert A Bouchard AE Summer L Dorsey AE EuiHo Park AE Marco T Buenrostro-Nava AE Peter P Ling AE John J Finer, P. Address, E. Park, M. T. Buenrostro-Nava, J. M. Chiera Á R A Bouchard Á S L Dorsey Á E Park Á M T Buenrostro-Nava Á J J Finer, and P. P. Ling, "Isolation of two highly active soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) promoters and their characterization using a new automated image collection and analysis system," *Plant Cell Rep*, vol. 26, pp. 1501–1509, 2007.
- [153] C. M. Hernandez-Garcia *et al.*, "High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) GmERF and Gmubi gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline," 2010.
- [154] M. Libault *et al.*, "An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants," *Plant J.*, vol. 63, no. 1, p. no-no, Apr. 2010.
- [155] G. Vancanneyt, R. Schmidt, A. O'Connor-Sanchez, L. Willmitzer, and M. Rocha-Sosa, "Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation," *MGG Mol. Gen. Genet.*, vol. 220, no. 2, pp. 245–250, Jan. 1990.
- [156] Z. Huang, Q. Chen, B. Hjelm, C. Arntzen, and H. Mason, "A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 103, no. 4, pp. 706–714, Jul. 2009.
- [157] J. P. Gallino *et al.*, "A Dehydration-Induced Eukaryotic Translation Initiation Factor iso4G Identified in a Slow Wilting Soybean Cultivar Enhances Abiotic Stress Tolerance in *Arabidopsis*," *Front. Plant Sci.*, vol. 9, no. March, pp. 1–22, 2018.
- [158] D. T. Le *et al.*, "Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissues at Late Developmental Stages under Drought Stress Revealed by Genome-Wide Transcriptome Analysis," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, p. e49522, Nov. 2012.
- [159] L. Wang, L. Liu, Y. Ma, S. Li, S. Dong, and W. Zu, "Transcriptome profiling analysis characterized the gene expression patterns responded to combined drought and heat stresses in soybean," *Comput. Biol. Chem.*, vol. 77, pp. 413–429, Dec. 2018.
- [160] J. H. Shin *et al.*, "Transcriptomic changes due to water deficit define a general soybean response and accession-specific pathways for drought avoidance," *BMC Plant Biol.*, vol. 15, no. 1, p. 26, Jan. 2015.
- [161] K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki, "A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress," *Plant Cell*, vol. 6, no. 2, pp. 251–264, Feb. 1994.
- [162] D. Bonetta and P. McCourt, "Genetic analysis of ABA signal transduction pathways," *Trends in Plant Science*, vol. 3, no. 6. Elsevier Current Trends, pp. 231–235, 01-Jun-

1998.

- [163] "PlantCare." [Online]. Available: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>. [Accessed: 08-Jul-2020].
- [164] F. Ishige, M. Takaichi, R. Foster, N. H. Chua, and K. Oeda, "A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants," *Plant J.*, vol. 18, no. 4, pp. 443–448, May 1999.
- [165] J. Zuo, Q. Niu, S. G. Møller, and N. Chua, "Excision in Transgenic Plants," *Nat. Biotechnol.*, pp. 157–161, 2001.
- [166] J. E. Garbarino and W. R. Belknap, "Isolation of a ubiquitin-ribosomal protein gene (ubi3) from potato and expression of its promoter in transgenic plants.," *Plant Mol. Biol.*, vol. 24, no. 1, pp. 119–27, Jan. 1994.
- [167] D. Dou *et al.*, "Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b," *Plant Cell*, vol. 20, no. 4, pp. 1118–1133, 2008.
- [168] L. Bortesi and R. Fischer, "The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 1, pp. 41–52, Jan. 2015.