

Tesis de Doctorado
PEDECIBA Biología

Explorando las rutas de escape del estrés como blancos para el mejoramiento genético de la soja



Andrea Luciana Fleitas

Tutora: Dra. Sabina Vidal

Cotutor: Dr. Eduardo Blumwald



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Laboratorio de Biología
Molecular Vegetal**



PEDECIBA
MEC-UDELAR

Tabla de contenidos

| | |
|--|------------|
| Agradecimientos | 2 |
| Resumen de la tesis | 3 |
| 1. Introducción | 5 |
| 1.1 Recursos genéticos para el mejoramiento de los cultivos | 5 |
| 1.2 Mejoramiento de la resistencia a la sequía en el contexto del cambio climático .. | 8 |
| 1.3 Cualquier rasgo puede ser positivo en las condiciones ambientales adecuadas.. | 10 |
| 1.4 Selección de genes candidatos para incrementar la resistencia a la sequía | 12 |
| 1.5 Control de las relaciones fuente-fosa por C y N | 13 |
| 1.6 C y N durante el déficit hídrico..... | 17 |
| 1.7 Senescencia | 20 |
| 1.8 Control hormonal de la senescencia | 22 |
| 1.9 Retraso de la senescencia como estrategia para mejorar los cultivos | 24 |
| 1.10 Antecedentes para la selección de los genes CV | 26 |
| 2. Objetivo general e hipótesis de trabajo | 31 |
| 3. Hoja de ruta | 32 |
| 4. Capítulo 1: Estudio de la ruta de vesiculación cloroplástica de soja durante la senescencia inducida por estrés | 32 |
| 4.1 Objetivos..... | 32 |
| 4.2 Resumen del manuscrito en español | 33 |
| 5. Manuscrito 1 | 35 |
| 6. Capítulo 2: Generación de herramientas para edición génica en soja | 92 |
| 6.1 Objetivos..... | 92 |
| 6.2 Resultados..... | 92 |
| 7. Artículo publicado | 94 |
| 8. Herramientas para edición génica en soja | 106 |
| 8.1 Generación y evaluación de sistemas de expresión e introducción de Cas9 y sgRNAs en soja y edición de los genes CV1, CV2 y CVI/CV2 | 106 |
| 8.2 Estrategias de introducción y expresión del sistema CRISPR/Cas9 en soja | 106 |
| 8.3 Métodos | 111 |
| 9. Discusión y perspectivas | 115 |
| 10. Referencias | 121 |

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores, Sabina y Eduardo, por haberme guiado en esta etapa de trabajo. A Sabina por todos estos años de trabajo juntas, el apoyo y el cariño, y a Eduardo por la generosidad durante mis pasantías en Davis y con el trabajo con el gen CV.

A todos quienes contribuyeron directamente en el desarrollo de este trabajo: Alex, por los q-PCRs, las ideas y la discusión de resultados; Mario, por ayudarme mucho con la expresión de la Cas9; Juan, por cuidar los embriones y Hiromi, por contribuir en la generación de construcciones para edición génica.

A todos mis compañeros de trabajo de Facultad de Ciencias, Facultad de Agronomía e INIA. Especialmente a Ceci con quien más compartí la mesada estos años en BMV.

A mis amigos y mi familia, que me han apoyado en todo aún sin saber bien de qué va mi trabajo.

A las agencias financiadoras:

ANII Programa de Becas de Doctorado.

ANII Programa de Movilidad e Intercambios Académicos.

Comisión Académica de Posgrados, Beca de Finalización de Doctorado.

ANII FCE “Estrategias de mejoramiento del cultivo de soja basadas en la modulación de los mecanismos de tolerancia y escape a la sequía”.

CSIC Grupos “Desarrollo de herramientas basadas en ingeniería genética de precisión para contribuir al mejoramiento genético de las plantas”. Grupo CSIC 1492.

RESUMEN DE LA TESIS

En esta tesis se estudian componentes novedosos que participan en la respuesta de senescencia inducida por estrés hídrico en soja y que tienen potencial para incrementar la tolerancia a la sequía mediante estrategias de edición génica.

La soja es la principal leguminosa cultivada, proporcionando más de un cuarto de la proteína total para la alimentación humana y animal en el mundo así como de la producción mundial de aceite. El mejoramiento del cultivo de soja ha llevado a la selección de variedades de alto rendimiento, sacrificando la diversidad genética en los cultivares modernos respecto a sus ancestros silvestres. La estrecha diversidad genética con la que cuentan los programas de mejoramiento de soja plantea un desafío importante para la generación de nuevas variedades, mejor adaptadas a las condiciones ambientales particulares de la región donde son cultivadas. La edición génica es una herramienta poderosa de mutagénesis dirigida que permite la modificación precisa y eficiente de los genomas vegetales. Entre estas, el sistema CRISPR/Cas9 se ha consolidado como la tecnología de edición génica más utilizada, robusta y versátil.

La senescencia es la última etapa del ciclo biológico de las plantas e implica la movilización de la biomasa acumulada durante las etapas de crecimiento vegetativo hacia sus órganos fosa. Diversos tipos de estrés ambiental pueden disparar la senescencia prematuramente, siendo ésta la principal causa de pérdidas en biomasa y en el llenado de grano, debido a la disminución de la capacidad fotosintética. Durante la senescencia, la degradación de los cloroplastos es un evento temprano. Los trabajos del grupo del Dr. Eduardo Blumwald (Universidad de California, Davis) han demostrado que mejorar la estabilidad cloroplástica en condiciones de estrés, es una estrategia promisoriosa para incrementar la tolerancia al estrés, retrasando la senescencia prematura de las plantas.

En este trabajo, se parte de la premisa de que la senescencia inducida por estrés tiene un efecto negativo en la productividad de los cultivos y que retrasando esta respuesta es posible incrementar el rendimiento de la soja en condiciones de estrés. En el capítulo 1, se describen los cambios transcripcionales que ocurren en soja en condiciones de estrés hídrico, con énfasis en las diferentes rutas vesiculares de degradación de componentes celulares. En particular, este trabajo se centra en la ruta de CCV (*CV Containing Vesicles*), observando diferencias en los perfiles de expresión temporal y espacial para los dos genes de soja (*CV1* y *CV2*) y sugiere una

Resumen de la tesis

especialización funcional para los dos miembros de esta familia de genes. En el capítulo 2, se describen las herramientas moleculares generadas para editar los genes CV mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Recursos genéticos para el mejoramiento de los cultivos

El mejoramiento genético de los cultivos tiene por cometido la obtención de plantas con características en algún aspecto deseables, como tener un mayor rendimiento, mejores cualidades nutricionales, o mayor resistencia a factores bióticos o abióticos. La biotecnología aplicada al mejoramiento vegetal ha contribuido a aumentar considerablemente el rendimiento de muchas de las especies cultivadas hoy en día. Las herramientas de fenotipado masivo permiten la medición de caracteres con gran precisión, al mismo tiempo que las herramientas de genotipado masivo expanden la capacidad para aplicar la genética cuantitativa a rasgos complejos a través del análisis mediante estudios de asociación de genomas completos (GWAS: *Genome-Wide Association Study*). Estos avances tecnológicos han potenciado enormemente el mejoramiento vegetal.

A lo largo de la historia, la mayoría de los cultivos han sufrido un incremento lento pero constante en su rendimiento, mientras que sólo unos pocos cultivos, principalmente cereales como el arroz, el trigo y el maíz, han incrementado muy significativamente su rendimiento en tiempos relativamente cortos (Liu et al., 2020). En particular, esta “revolución verde” que ha ocurrido para algunos cultivos fue determinada por unos pocos genes relacionados con la arquitectura del canopeo, que permitieron mejoras en la respuesta de los cultivos a las aplicaciones de fertilizante, la transición hacia hábitos de siembra más intensivos y automatización de las metodologías de cosecha (Wang et al., 2021).

La soja cultivada (*Glycine max*) fue domesticada en China a partir de la soja silvestre (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.), hace aproximadamente 5000 años (Caldwell y Howell, 1973). La selección de variedades de mayor rendimiento ha producido variedades de soja con mayor número de inflorescencias, semillas más grandes, tallos más gruesos y canopeos más erguidos en comparación con sus antecesores (Caldwell y Howell, 1973, Rincker et al., 2014). El mejoramiento genético ha tenido un impacto en el rendimiento de este cultivo, que ha aumentado su producción más de 13 veces entre 1961 y 2020 (FAOSTAT, 2022). Sin embargo, el principal factor que ha contribuido en este incremento productivo, es el aumento del área sembrada (FAO, 2021), mientras que su rendimiento por hectárea no ha cambiado significativamente en las décadas recientes. Estos datos de rendimiento contrastan con los obtenidos para los cultivos de arroz, maíz y trigo que formaron parte de la revolución verde y que incrementaron muy significativamente su rendimiento en las últimas décadas. (FAOSTAT, 2022). En la actualidad, la soja se ha convertido en la principal leguminosa cultivada, proporcionando más de un

Introducción

cuarto de la proteína total para la alimentación humana y animal en el mundo así como de la producción mundial de aceite (FAO, 2021).

La diversidad genética dentro de una especie constituye el recurso principal para el mejoramiento genético de los cultivos. Para mejorar un rasgo específico por métodos convencionales, tiene que existir diversidad sobre el mismo en la población de mejoramiento. Las prácticas de selección asociadas a la domesticación de los cultivos han producido una reducción de esta diversidad. En el caso de la soja, han ocurrido varios cuellos de botella, sacrificando aproximadamente la mitad de la diversidad genética en los cultivares modernos respecto a los ancestros silvestres (Hyten et al., 2006; Zhou et al., 2015). Por ejemplo, solo 17 accesiones fueron utilizadas como los principales parentales durante el desarrollo de los cultivares modernos norteamericanos (Hyten et al., 2006). La diversidad es aún más estrecha en los programas de mejoramiento sudamericanos, cuya base genética se nutre del germoplasma norteamericano (Maldonado dos Santos et al., 2016).

Una forma de introducir biodiversidad es incrementar el número de mutaciones utilizando mutagénesis al azar. Este tipo de estrategia ha sido utilizada con éxito para producir más de 3000 variedades comerciales de vegetales comestibles (Oladosu et al., 2016). Existen disponibles tres librerías de mutantes de soja y se han generado un total de 29762 mutantes M2 (Tsuda et al., 2015; Li et al., 2017a; Espina et al., 2018). Además de las líneas mutagenizadas, se han colectado más de 50000 accesiones de soja en el mundo, incluyendo muchos germoplasmas silvestres. La introgresión de estas líneas silvestres dentro de cultivares establecidos permite incrementar su diversidad genética y es otra práctica efectiva para generar nuevas variedades de élite (Liu et al., 2020).

La transgénesis, dirigida a incorporar selectivamente características de interés, ha sido de los hitos biotecnológicos que más han impactado en las prácticas de producción. Sin embargo, la amplia mayoría de los eventos comerciales aprobados contienen genes que confieren resistencia a herbicidas. En la actualidad existen 540 eventos transgénicos aprobados, de los cuales el maíz (244), el algodón (67), la papa (51), la canola (45) y la soja (43) son los principales (ISAAA, 2022). Dentro de los eventos de soja, 12 presentan modificaciones en su composición de ácidos grasos, 1 presenta resistencia a nemátodos (BASF: GMB151 - expresión de Cry14Ab1 de *Bacillus thuringiensis*), 1 presenta mejoras en el rendimiento (Montsanto: MON87712 - expresión del gen *bbx32* de *Arabidopsis thaliana*), y solamente 2 están mejorados para tolerancia a sequía (Verdeca: HB4 y HB4 x GTS 40-3-2 - expresión de factor de transcripción HB4 de girasol) (ISAAA, 2022). Cabe destacar que de los eventos mencionados, solamente los últimos dos fueron

Introducción

desarrollados en Sudamérica, específicamente en Argentina (González et al., 2020).

La edición génica es otra herramienta poderosa de mutagénesis dirigida que permite la modificación precisa y eficiente de los genomas vegetales. El sistema CRISPR/Cas9 se ha consolidado como la tecnología de edición génica más utilizada y robusta. En este sistema, la endonucleasa Cas9 es guiada a una secuencia blanco en el DNA genómico por moléculas sintéticas de RNA, que pueden estar en su forma dual (crRNA-gRNA) o como molécula única (sgRNA) (Anders y Jinek, 2014). Como consecuencia de la acción de esta endonucleasa, el corte en la cadena de DNA es reparado por la célula, mediante la vía de reparación ilegítima (*non-homologous end joining*, NHEJ) o mediante la vía de reparación por homología (*homologous-directed repair*, HDR). La vía NHEJ es propensa a errores y puede generar inserciones o deleciones pudiendo interrumpir un gen o alterar su expresión. La HDR puede ocurrir cuando un fragmento de DNA homólogo está presente, permitiendo reemplazar un fragmento del genoma (Kim, 2014). En plantas, esta metodología se implementa frecuentemente utilizando la transgénesis para introducir una construcción génica que permita la expresión de Cas9 y de los gRNAs dentro de la célula, esperando que estas moléculas actúen sobre una secuencia blanco generando una alteración. Una vez obtenida la modificación deseada, la construcción puede ser eliminada del genoma de la descendencia por segregación (Atkins y Voytas, 2020).

Algunos estudios han reportado metodologías de edición “libres de DNA”. Estos desarrollos se basan, por un lado, en la introducción en las células vegetales de los RNA guía y del transcripto de Cas9 (mRNA-Cas9) generados mediante transcripción *in vitro* (IVT), o por otro lado, en la introducción de complejos ribonucleoprotéicos Cas9-gRNA pre-ensamblados (RNPs) (Anderson et al., 2018; Bankar et al., 2022; Liang et al., 2017; Malnoy et al., 2016; Subburaj et al., 2016; Woo et al., 2015; Zhang et al., 2016). Las metodologías de edición génica libres de DNA aventajan a las basadas en la transgénesis en que los RNPs (o la proteína Cas9 derivada de la traducción del mRNA-Cas9) actúan transitoriamente sobre el genoma, reduciendo la probabilidad de que presenten efectos *off-target*, esto es, que actúen fuera del sitio blanco deseado. Asimismo, no es necesario segregar las construcciones del genoma, lo que reduce los tiempos necesarios para generar una planta editada, libre de secuencias exógenas (Metje-Sprink et al., 2019).

La edición génica libre de DNA es un área en crecimiento y existen aún muchas consideraciones prácticas que requieren optimización. Un cuello de botella fundamental es la regeneración de las plantas a partir de un tejido o células editadas en ausencia de agentes selectivos. Si bien existen varios reportes de edición génica utilizando RNPs en protoplastos de diversas

Introducción

especies, son pocos en los que logran efectivamente regenerar una planta a partir de protoplastos (Zhang et al., 2016; Liang et al., 2017; Andersson et al., 2018). En última instancia, el desarrollo de este tipo de metodologías es particularmente relevante para especies recalcitrantes a la transformación o para especies de propagación vegetativa, en las que la segregación del transgen no es una opción (Kanchiswamy, 2016).

En años recientes, han habido varios ejemplos de productos generados mediante edición génica que han sido liberados en el mercado Estadounidense sin la revisión del Departamento de Agricultura (Kuzma, 2016). Entre ellos, un champiñón resistente a la oxidación, una variedad de soja con mayor contenido de ácido oleico, una variedad de canola resistente a sulfonilurea y maíz con mayor contenido de amilopectina (Turnbull et al., 2020). En América Latina la regulación se encamina por un rumbo similar (Turnbull et al., 2020). Quiere decir que la incorporación de estas nuevas tecnologías de mejoramiento permitiría reducir muchísimo los costos y los tiempos para liberar un evento, lo que es un elemento democratizador para la academia y los programas de mejoramiento.

1.2. Mejoramiento de la resistencia a la sequía en el contexto del cambio climático

La sequía, en combinación con la necesidad de producir alimentos para una población mundial que continúa creciendo, constituye uno de los principales desafíos para la agricultura en el contexto del cambio climático. Se estima que la cantidad de agua disponible para el riego se reducirá como resultado de la eliminación de muchos acuíferos y la competencia con otros usos industriales, cotidianos y recreativos del agua (Harrison et al., 2014). Por otra parte, no existe consenso en relación a si los episodios de sequía serán más frecuentes en el futuro, pero lo cierto es que continuarán ocurriendo y probablemente su frecuencia aumentará año a año (IPCC, 2019).

Las repercusiones de la sequía dependen de un triángulo “riesgo, exposición, vulnerabilidad”: el riesgo está determinado por las condiciones ambientales; la exposición, por las prácticas agrícolas como la posición anual del crecimiento de cierto cultivo; y la vulnerabilidad, de las variedades utilizadas y las prácticas de cultivo empleadas para su producción (Tardieu et al., 2018).

En Uruguay, desde el año 2001 el área del cultivo de soja ha crecido dramáticamente ocupando actualmente un área superior a 1.5 millones de hectáreas. Entre 2001 y 2014 las exportaciones de soja pasaron de U\$S 1.6 millones a más de U\$S 1600 millones, lo que llevó a que se consolidara ese año como el mayor producto de exportación del país (MGAP, anuario estadístico agropecuario 2021). En los últimos años Uruguay se ha posicionado

Introducción

dentro de los seis principales exportadores de soja en el mundo (FAO, 2021). Recientemente, la caída en el precio de la soja produjo una disminución del área sembrada. A pesar de ello, en 2021 las exportaciones se ubicaron en torno a los US\$ 900 millones, de modo que la soja continúa siendo uno de los principales productos de exportación del país, situándose por debajo de la carne y los productos cárnicos y la celulosa (informe anual de comercio exterior, 2021).

Como se mencionó, el principal factor que ha contribuido al aumento de la producción de soja a nivel global es el aumento del área sembrada, y Uruguay no es la excepción, ya que el rendimiento para este cultivo se encuentra estancado en aproximadamente 2000 kg/ha (MGAP, anuario estadístico agropecuario 2021), aproximadamente un 50 % de su rendimiento potencial (atlas global de brechas, 2021). A esto se le suma la alta variabilidad climática del país, siendo el déficit hídrico el principal factor limitante. A modo de ejemplo, las zafas 2016/2017 y 2017/2018 mostraron comportamientos tremendamente contrastantes. Mientras que en 2016/2017 la cosecha fue record, alcanzando un rendimiento promedio de más de 3000 kg/ha, en 2017/2018 el rendimiento promedio fue de poco más de 1200 kg/ha; esto supone una caída del 60 % frente a la zafra anterior (MGAP, anuario estadístico agropecuario 2021). Tomando en cuenta las previsiones ambientales ligadas al cambio climático global, es esperable que la vulnerabilidad del cultivo continúe aumentando.

La estrecha variabilidad genética de la que se dispone en las poblaciones de mejoramiento genético de soja, dificulta el desarrollo de variedades con mejor tolerancia y rendimiento en condiciones de estrés ambiental. A la fecha, son pocos los genes que han demostrado ser clave para mejorar la tolerancia a la sequía en soja. Las primeras fuentes descritas de tolerancia a estrés hídrico fueron líneas que exhiben un fenotipo de marchitamiento lento ("*slow wilting genotypes*", Carter et al., 2003). Se sabe que el marchitamiento lento es una característica multigénica, moderadamente heredable, que permite la conservación del agua en el suelo, lo que beneficia el desempeño del cultivo al establecerse un régimen de sequía (Prince et al., 2015; Ries et al., 2012). Una serie de características han mostrado ser relevantes para el establecimiento de este fenotipo. Entre ellas, una tasa de transpiración limitada en condiciones de baja presión de vapor atmosférico (Fletcher et al., 2007), un sistema radicular mayor (Hudak y Patterson, 1995) y el mantenimiento de turgor, la transpiración e intercambio de CO₂ en las hojas (Sadok y Sinclair 2009; Sloane et al. 1990), han sido descritas. Si bien esta característica ha sido utilizada como un marcador visual para seleccionar variedades de soja tolerantes a la sequía a campo, no se conoce con precisión cuáles son los mecanismos moleculares subyacentes (Charlson et al., 2009; Kunert et al., 2020). A pesar de que se han identificado algunos QTLs (*Quantitative Trait Loci*) cuya contribución a la

Introducción

característica de marchitamiento lento es significativa (Pathan et al., 2007; Abdel-Haleem et al., 2011; Hwang et al., 2015; 2016; Ye et al., 2020), en general éstos son inestables entre poblaciones y ambientes, por lo que se requieren trabajos de confirmación para validarlos (Kaler et al., 2017; Ye et al., 2020).

Este trabajo pretende caracterizar nuevos componentes que participan en las de respuestas al déficit hídrico en soja, con el objetivo de generar herramientas basadas en la edición génica para incrementar la resistencia al estrés en este cultivo. Asimismo, en el desarrollo de este trabajo se han generado una serie de herramientas para la manipulación genética de la soja mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9, que quedan nucleados en esta tesis y puestos a disposición de la comunidad.

1.3. Cualquier rasgo puede ser positivo en las condiciones ambientales adecuadas

El estrés hídrico en plantas resulta de una disponibilidad insuficiente de agua en el suelo para cumplir con la demanda del canopeo en un momento particular, lo que produce un cambio en el status hídrico. Esta dinámica está determinada por la capacidad del sistema radicular para proveer de agua a la parte aérea y de la tasa de transpiración, la cual combina las características de la parte aérea con la presión evaporativa (Tardieu et al., 2015, 2018).

Durante la sequía, la reducción del flujo de agua produce un aumento de la viscosidad de la savia del floema, reduciendo el transporte de azúcares. Esto afecta la comunicación entre la fuente y la fosa: al reducir la llegada de azúcares a la fosa, la actividad y la fuerza de la fosa se reducen, la fuerza de la fuente disminuye y en consecuencia se acumulan carbohidratos no estructurales (CNEs) en los órganos fuente. Estos carbohidratos tienen un rol fundamental en la comunicación fuente-fosa, en la regulación de la fotosíntesis y otros procesos metabólicos y de transporte y en la señalización de las respuestas frente a la sequía (Lastdrager et al., 2014; Tardieu et al., 2016).

En las plantas se identifican tres tipos de estrategias generales para enfrentar condiciones de sequía (Carrow, 1996) (Figura 1). En los mecanismos de escape la planta acelera la culminación de su ciclo de vida antes de que las condiciones ambientales sean demasiado severas. Esto implica la puesta en marcha de rápidos cambios fisiológicos y en el desarrollo, que incluyen la maduración y floración prematura, así como la inducción de dormancia en la estación seca. Los mecanismos de evasión consisten en incrementar la capacidad de mantener en los tejidos un potencial de agua relativamente alto a pesar de la baja disponibilidad de agua en el suelo. Estos mecanismos involucran el aumento de la profundidad y de la eficiencia del sistema radicular,

Introducción

junto con estrategias para conservar el agua, como el cierre estomático, la reducción de la conductancia cuticular y del área foliar y la disminución de la absorción de luz. Finalmente, las estrategias que tienden a mantener la productividad de la planta en condiciones de restricción hídrica son consideradas mecanismos de tolerancia. Éstos involucran cambios metabólicos para el mantenimiento de la turgencia celular a través de mecanismos de ajuste osmótico, del aumento en la plasticidad celular, de la acumulación de solutos y de proteínas con funciones de protección celular, entre otros (Carrow, 1996; Jones et al., 1981; Jones, 2004). La resistencia a la sequía es entonces una característica compleja y multifactorial, que depende de la combinación de muchos genes y que deriva en la alteración de varios caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

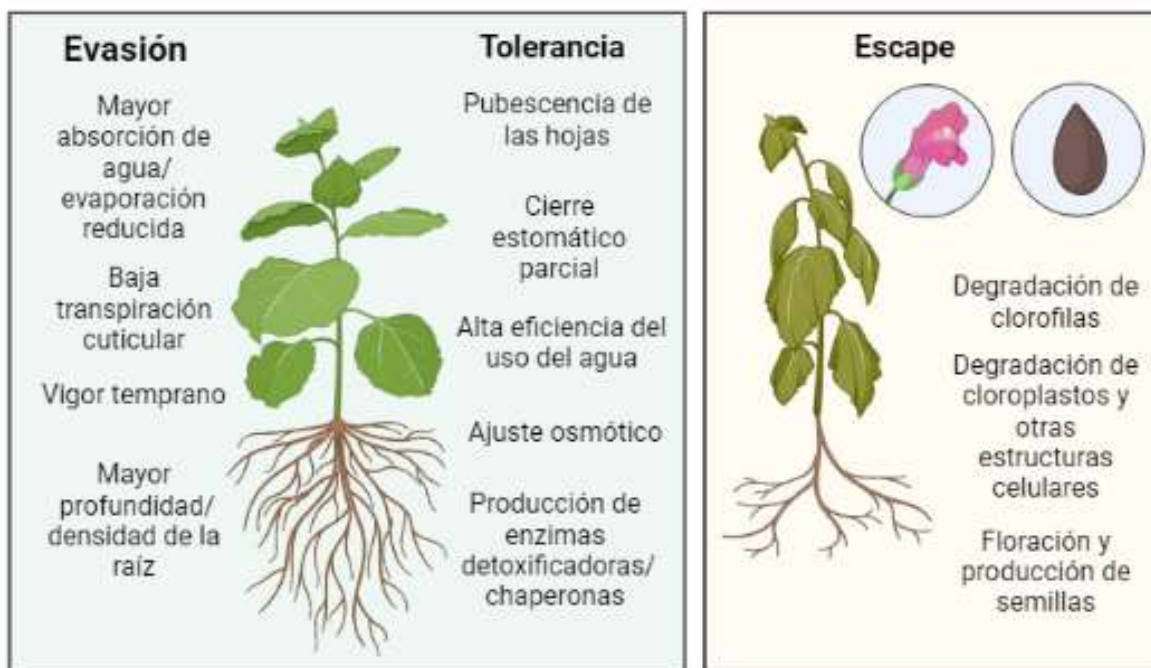


Figura 1. Mecanismos de resistencia y escape del estrés. Los mecanismos de resistencia pueden separarse en mecanismos evasión y de tolerancia del estrés. Los mecanismos de escape del estrés aceleran el ciclo de vida de la planta para dejar al menos unas pocas semillas.

Estas respuestas, que suelen ser muy diversas, pueden ser consideradas beneficiosas o perjudiciales dependiendo del escenario ambiental que se esté manejando. Por ejemplo, el rendimiento tiende a incrementar con la duración del ciclo de vida debido a un aumento de la fotosíntesis acumulada. No obstante, durante períodos largos de sequía, un ciclo vital extenso aumenta la probabilidad de que las etapas de floración y llenado de grano, más sensibles a la deshidratación, coincidan con la deprivación de agua del suelo. En este sentido, un ciclo de vida corto es un rasgo positivo en condiciones de períodos de sequía largos y terminales, pero al limitar la acumulación de biomasa, es

Introducción

negativo en condiciones donde existe cierta disponibilidad de agua (Tardieu et al., 2018).

En la mayoría de las plantas, el rendimiento se ve especialmente afectado cuando el déficit hídrico ocurre en el entorno de la floración. El aborto de los granos es un proceso adaptativo que permite que las plantas produzcan semillas viables a pesar de la reducción del suministro de carbono (C). Una baja tasa de aborto es un rasgo deseable en condiciones de estrés moderadas, incluso en las especies cultivadas el aborto de los granos puede ser favorable en condiciones de sequía extrema, al garantizar desarrollo y el llenado de un número limitado de granos (Tardieu et al., 2018).

La domesticación y el mejoramiento de las especies cultivadas han llevado a la reducción del sistema radicular en comparación con los ancestros silvestres. Esto se debe probablemente al costo metabólico del crecimiento y mantenimiento de las raíces. La respiración por parte de las raíces puede consumir hasta un 50 % de la energía generada por fotosíntesis diariamente. La selección de cultivares de élite con un cociente optimizado entre la masa de los granos y la biomasa total ha promovido la selección de genotipos con una relación entre raíces y parte aérea parsimoniosa. El efecto positivo de un sistema radicular profundo y vigoroso también depende del escenario climático. Si la disponibilidad de agua ocurre exclusivamente durante las primeras etapas de crecimiento, puede ser beneficioso reducir el consumo de agua en etapas tempranas para asegurar su disponibilidad más tardíamente. Por lo tanto, como otros rasgos, la arquitectura de la raíz tiene un efecto contexto-dependiente sobre el rendimiento en condiciones de déficit hídrico (Tardieu et al., 2018).

1.4. Selección de genes candidatos para incrementar la resistencia a la sequía

Los ejemplos planteados ponen de manifiesto que es extremadamente difícil concebir un fenotipo de resistencia al estrés hídrico que se ajuste a la multitud de posibles escenarios ambientales y de condiciones de producción de un cultivo en particular.

Muchos de los genes candidatos para conferir tolerancia al estrés hídrico, a pesar de mostrar un efecto benéfico en condiciones controladas, cuando son evaluados en condiciones de campo, no confieren las mismas ventajas. Por lo tanto, la pregunta más relevante quizás no es si determinado gen o alelo confiere tolerancia a sequía, pero en cambio si el mismo contribuye positivamente al rendimiento del cultivo en una proporción apreciable de años y escenarios productivos, o si continuará teniendo un efecto positivo sobre el rendimiento de cara al cambio climático (Tardieu, 2012).

Introducción

A pesar de estas observaciones, varias características asociadas con la tolerancia al estrés son similares para múltiples especies crecidas en diferentes condiciones. Aunque el rendimiento está influenciado por las prácticas agronómicas, como el riego, la fertilización o el control de plagas, los factores internos que son determinantes son la capacidad de las plantas para capturar luz y utilizar esta energía para asimilar C y la capacidad para relocalizar esta biomasa hacia los órganos cosechables (Muller et al., 2011), resaltando la importancia de tener en cuenta las relaciones de fuente y fosa, inicialmente propuestas por Mason y Maskell (1928) (Figura 2). Muchas de estas características generales buscan maximizar las fuerzas de la fuente y de la fosa y mantener el transporte de agua y nutrientes en condiciones de óptimas de crecimiento o de estrés (Rodrigues et al., 2019).

Dentro de las características asociadas con la tolerancia al déficit hídrico podemos encontrar: 1) la presencia de raíces con mayor largo, diámetro y ángulo para explorar suelos más profundos y firmes (Yu et al., 2013; Yu et al., 2016; Wang et al., 2018; Lynch, 2013; Jeong et al., 2010; Uga et al., 2014; Prince et al., 2015; Manalavan et al., 2015); 2) un xilema y floema adaptados para lidiar con un mayor flujo de agua y nutrientes (Leggewie et al., 2003; Dasgupta et al., 2014; Wang et al., 2017); 3) una acumulación de biomasa incrementada y una adecuada removilización de C en etapas reproductivas que permitan una mayor formación (aborto reducido) de semillas (Li et al., 2013; Ghneim-Herrera et al., 2017; Shi et al., 2015); 4) una apertura y densidad estomáticas óptimas, que permitan la transpiración sin comprometer la fotosíntesis (Bang et al., 2019; Yu et al., 2016; Zheng et al., 2017); y 5) una cantidad aumentada de proteínas con capacidad osmoprotectora y para eliminar o reparar el daño causado por las ROS y proteger al fotosistema II, reduciendo el daño celular (Bang et al., 2019; Selvaraj et al., 2017; Jeong et al., 2013; Rodrigues et al., 2019).

1.5. Control de las relaciones fuente-fosa por C y N

Las relaciones fuente-fosa están controladas por la actividad de numerosas enzimas y la alteración de su actividad puede ser utilizada para modificar estas relaciones (Chang et al., 2017). El transporte de asimilados carbonados y nitrogenados juega un rol preponderante en las interacciones fuente-fosa. Esto incluye el transporte de corta distancia (de carga y descarga del floema) y el transporte de larga distancia por el floema (Rolland et al., 2006; Julius et al., 2017; Eom et al., 2015; Lastdrager et al., 2014). La eficiencia de los transportadores transmembrana es el principal factor que controla esta resistencia y la manipulación de estos transportadores tiene gran potencial para aumentar el rendimiento de los cultivos y para generar plantas con mejor rendimiento y mayor tolerancia al estrés ambiental.

Introducción

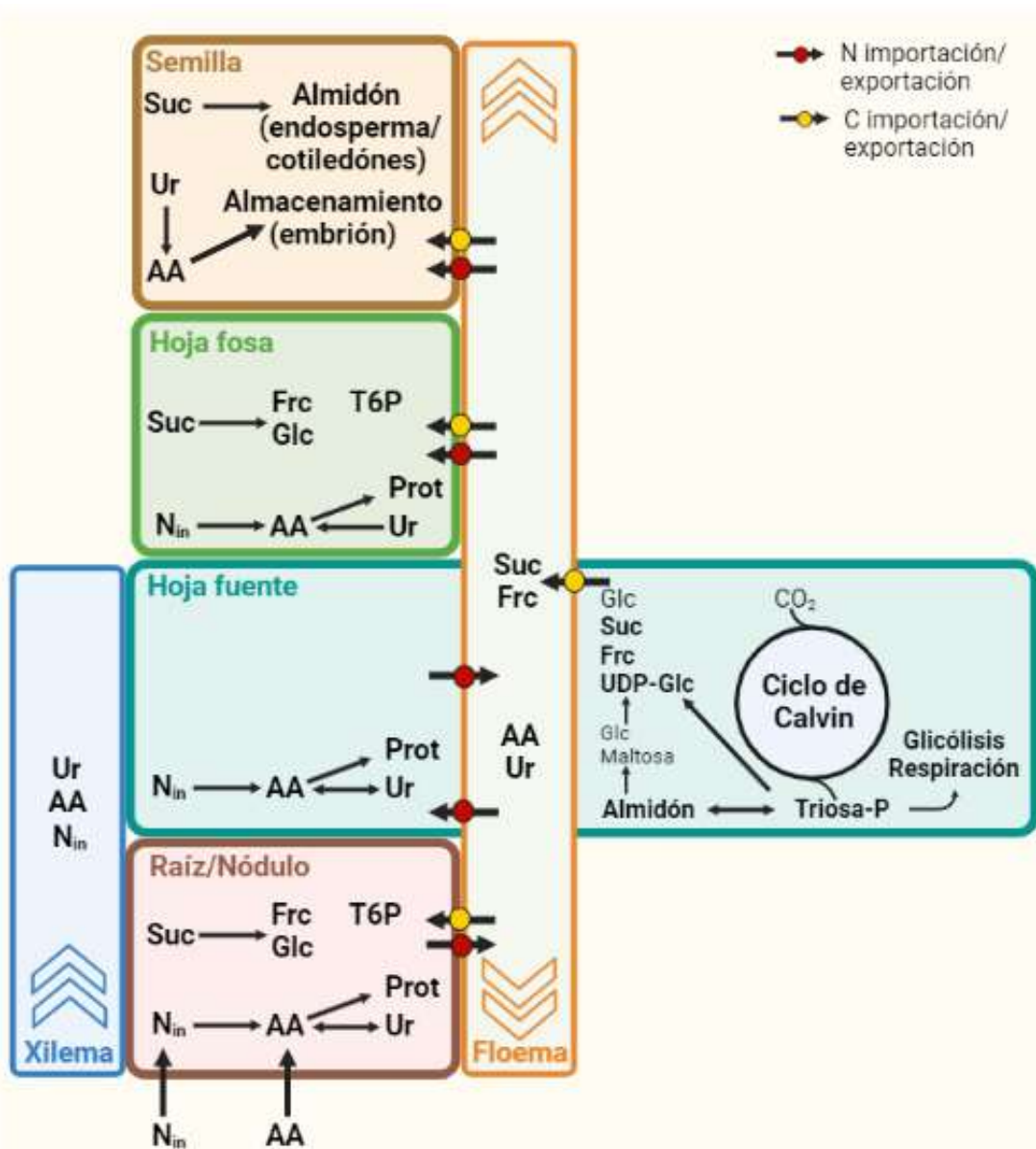


Figura 2. Transporte de nitrógeno y carbono y relaciones fuente-fosa en la planta. La oxidación fotoquímica del agua a oxígeno está acoplada a la generación de ATP y nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADPH) mediante reacciones que tienen lugar en la membrana de los tilacoides. Las reacciones del C catalizan la reducción de CO₂ a carbohidratos consumiendo el ATP y el NADPH generados durante la fotofosforilación mediante enzimas localizadas en el estroma de los cloroplastos (Borland et al., 2014). En la mayoría de las especies vegetales, las triosas fosfato generadas en el ciclo de Calvin (gliceraldehído-3-fosfato) pueden ser utilizadas para la síntesis de sacarosa en el citosol o pueden ser utilizadas para la síntesis de almidón dentro del cloroplasto. La sacarosa es el principal carbohidrato translocado por el floema y el almidón es la forma más común de almacenar el C. En los órganos fuente, los carbohidratos solubles (sacarosa, fundamentalmente) son cargados en el floema y son descargados en los órganos fosa (Rolland et al., 2006). El transporte de corta distancia, de carga y descarga, es activo y establece un gradiente de presión en el floema. El transporte de larga distancia por los tubos cribosos es pasivo y en masa, y es empujado por el gradiente de presión (Knoblauch et al., 2016). Los azúcares son cargados activamente en los tubos cribosos y las células acompañantes a través de transportadores selectivos que acoplan el transporte de sacarosa al transporte inverso de H⁺, estos son los transportadores SUC y SUT (Julius et al., 2017). En el otro extremo, la descarga del floema también puede ser simplástica o apoplástica. La descarga simplástica se ha observado en hojas jóvenes en algunas dicotiledóneas, como tabaco o

Introducción

remolacha, y en los tejidos meristemáticos y la zona de elongación del tip de la raíz. La forma más común de descarga del floema tiene un paso apoplástico lo que permite el control sobre el transporte a través de la membrana. Cuando esto ocurre, la sacarosa puede sufrir algún tipo de procesamiento en el apoplasto, siendo convertida en glucosa y fructosa por la invertasa de la pared celular (CW-INV), lo que constituye un paso de control sobre el transporte hacia la fosa. Algunos transportadores de la misma familia de antiportadores de sacarosa/H⁺ también participan en la descarga del floema (Julius et al., 2017). Los azúcares neutros, como la sacarosa, la fructosa y la glucosa pueden además ser movilizados a través de la familia de transportadores SWEET (Eom et al., 2015; Lastdrager et al., 2014). Las plantas absorben N inorgánico principalmente bajo la forma de nitrato (NO₃⁻) y amonio (NH₄⁺) pero la importación de aminoácidos y otros compuestos orgánicos nitrogenados también juega un rol significativo en algunos suelos, ambientes y especies (Tegeeder et al., 2018). Varios transportadores de N inorgánico y orgánico con diferentes afinidades y especificidades se han identificado en la raíz. Proteínas de la familia NRT/NPF (*Nitrate Transporter1/Peptide Transporter*) y NRT2 son antiportadores de NO₃⁻/H⁺. Los transportadores de la familia CLC (*Chloride Channel*) también participan en la absorción de NO₃⁻. Como el exceso de amonio es tóxico para las plantas, su absorción y asimilación están estrechamente reguladas. Existen transportadores saturables de alta afinidad (AMTs, *Ammonium Transporters*) y transportadores no saturables de baja afinidad (acuaporinas y canales catiónicos). También existen transportadores de aminoácidos pertenecientes a las familias APC (*Amino acid-Polyamine-Choline*) y UmamiT (*Usually Multiple Acids Move In and Out Transporters*). Dentro del grupo APC existen tres familias de transportadores: los AAPs (*Amino Acid Permeases*), los LHTs (*Lysine/Histidine-like Transporters*) y los ProTs (*Proline and Glycine Betaine Transporters*). El NO₃⁻ es reducido en raíces y hojas a nitrito (NO₂⁻) por la nitrato reductasa (NR) en el citosol. El NO₂⁻ es un ión reactivo y potencialmente tóxico por lo que es rápidamente transportado a través del transportador de NO₂⁻, NITR2, hacia los cloroplastos (en las hojas) o a los plástidos (en la raíz) donde es convertido en NH₄⁺ por acción de la nitrito reductasa (NiR). Las plantas evitan la toxicidad del NH₄⁺ al rápidamente convertirlo en aminoácidos gracias a la acción de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (también conocida como glutamina:2-oxoglutarato aminotransferasa, GOGAT). Los aminoácidos sintetizados en los cloroplastos y en el citosol se mueven hacia el floema a través de transportadores. Las plantas contienen dos clases de GS, una en el citosol y otra en los cloroplastos o plástidos. Las formas citosólicas producen glutamina para el transporte intracelular de nitrógeno; la GS en los plástidos de la raíz genera nitrógeno en forma de amidas para el consumo local; la GS en los cloroplastos de la parte aérea reasimila el NH₄⁺ producido durante la fotorrespiración (Lam et al. 1996). Las plantas también tienen dos tipos de GOGAT, una que acepta electrones del NADH y otra que acepta electrones de la ferredoxina. La NADH-GOGAT se localiza en los plástidos de órganos no fotosintéticos; en las raíces está involucrada en la asimilación de NH₄⁺ absorbido desde la rizósfera; en los haces vasculares de las hojas en desarrollo asimila glutamina translocada desde las raíces u hojas en senescencia. La Fd-GOGAT se encuentra en los cloroplastos y participa en la fotorrespiración (Masclaux-Daubresse et al., 2010). El amonio puede ser asimilado vía una ruta alternativa utilizando la glutamato deshidrogenasa (GDH). Una forma de la GDH NADH-dependiente se localiza en las mitocondrias y una forma NADPH-dependiente se localiza en los cloroplastos. Aunque ambas formas son relativamente abundantes, no pueden sustituir a la ruta GS-GOGAT para asimilar NH₄⁺. En las leguminosas, el NH₄⁺ fijado por la fijación biológica de N en los nódulos debe ser convertido en alguna forma de N orgánico antes de ser transportado. Las leguminosas pueden separarse en exportadoras de amidas o exportadoras de ureidos según la forma de N orgánico presente en la savia del xilema. En las leguminosas de clima templado, como la arveja (*Pisum*), el trébol (*Trifolium*), el poroto (*Vicia*) y la lenteja (*Lens*), los principales productos exportados son amidas (asparagina o glutamina). Los ureidos son exportados por leguminosas de clima tropical, como la soja (*Glycine*), el poroto (*Phaseolus*), el maní (*Arachis*). Los tres principales ureidos producidos son la alantoína, el ácido alantoico y la citrulina. El N orgánico (aminoácidos, ureidos) que no es utilizado puede ser almacenado temporalmente en el citosol o la vacuola o puede ser utilizado para la síntesis de proteínas. Las raíces y las hojas en desarrollo son las principales fosas para el N durante la etapa vegetativa, mientras que las flores, las frutas y las semillas son las principales fosas durante la etapa reproductiva. El transporte de N desde la raíz hacia las hojas ocurre por el xilema, mientras que el reparto de N desde las fuentes hacia las fosas ocurre a través del floema.

Introducción

Las enzimas que participan en la degradación de la sacarosa (especialmente a nivel de la fosa) son determinantes en la distribución del C y el desarrollo de la planta. Por ejemplo, una mayor actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa en el endosperma de trigo se correlaciona con un aumento del llenado de grano y un mayor rendimiento. Se ha demostrado que la sacarosa-fosfato sintasa (SPS) interactúa en planta con la sacarosa-fosfato fosfatasa (SPP); la expresión de una construcción de fusión entre ambos genes aumenta la actividad de la fuente en *Arabidopsis* y álamo (Chang et al., 2017).

La expresión de AtSWEET15 (SAG29) se encuentra muy inducida durante la senescencia y las plantas que sobreexpresan AtSWEET15 muestran senescencia acelerada e hipersensibilidad a la sal, mientras que los mutantes *knock out* (KO) son menos sensibles al estrés salino. De manera similar, la sobreexpresión de OsSWEET5, un transportador de galactosa, causa retraso en el crecimiento y la senescencia temprana en arroz (Eom et al., 2015). En arroz, el crecimiento se ve significativamente disminuido cuando la actividad de OsSUT2, un transportador tonoplástico que participa en la exportación de azúcares desde las hojas, se ve afectada (Eom et al., 2011). De igual forma, en papa, la inhibición del StSUT1, localizado en el tubérculo, enlentece el crecimiento durante etapas tempranas del desarrollo de este órgano, lo que sugiere su participación en la descarga del floema (Kühn et al., 2003). Por otro lado, la inhibición independiente de LeSUT1 o LeSUT2 en tomate evidenció que SUT1 es esencial en la carga del floema, mientras que SUT2 es esencial para el crecimiento del tubo polínico (Hackel et al., 2006). Estos ensayos realizados sobre diferentes especies evidencian el rol especie-específico que pueden tener algunos genes homólogos. El efecto de manipular las propiedades de la fuente, la fosa o el flujo entre ellos está lejos de ser lineal y en muchos casos se han observado diferentes efectos, incluso contrastantes, en distintos cultivos. Esto puede deberse a peculiaridades metabólicas y regulatorias de cada especie, además de relaciones fuente-fosa cambiantes según estadíos y condiciones de crecimiento (Chang et al., 2017).

La manipulación de la asimilación y el metabolismo de N también tiene el potencial de influenciar las relaciones fuente-fosa y el rendimiento (Tegeder et al., 2018; Masclaux-Daubresse et al., 2010). Por ejemplo, la sobreexpresión de la glutamina sintetasa citosólica 1 (GS1) incrementa la eficiencia del uso de N y la productividad en diversas especies (Thomsen et al., 2014). La sobreexpresión del factor de transcripción Dof1 llevó a la acumulación de muchos genes involucrados en la producción de esqueletos carbonados como la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), lo que mejora la asimilación de N y el crecimiento, especialmente en condiciones de baja disponibilidad de N (Chang et al., 2017). Asimismo, se determinó en *Arabidopsis* que el transportador de aminoácidos AAP8 (*aminoacid permease 8*), el cual es expresado en el floema de las hojas fuente, juega un rol importante en la carga del floema y el reparto

Introducción

fuente-fosa de N. Mutantes KO *aap8* tienen un número reducido de vainas y de semillas (Santiago y Tegeder, 2016). Por otra parte, plantas de arroz que sobreexpresan el transportador de NH_4^+ *OsAMT1* tienen una mayor permeabilidad para NH_4^+ en la raíz y un mayor rendimiento en condiciones óptimas y subóptimas de NH_4^+ (Ranathunge et al., 2014). Recientemente, Lu et al. (2022) demostraron que la sobreexpresión de un transportador de ureidos en soja (*UPS1*) aumenta la exportación de ureidos desde los nódulos con efectos positivos sobre la fijación de N y el rendimiento de las plantas.

El metabolismo del C y del N están estrechamente vinculados. Es importante notar que el efecto de retroalimentación de los CNEs sobre la actividad de la fuente depende fuertemente del contenido de N de la planta. Martin et al. (2002) demostraron que la inhibición de la expresión de los genes fotosintéticos producida por la acumulación de CNEs es sólo evidente en condiciones de restricción de N. Existe evidencia de que el exceso de CNEs en la fuente reduce la eficiencia fotosintética y/o promueve la senescencia prematura de las hojas en condiciones de restricción de N, pero no lo hace bajo condiciones de suministro de N elevado (Pourtau et al., 2004; Aoyama et al., 2014). El N puede influenciar el metabolismo de C mediante diversos mecanismos. Es un componente esencial de la clorofila, la RubisCO y otros componentes de la maquinaria fotosintética. Además, el N puede influenciar la expresión de genes fotosintéticos y la senescencia de las hojas al interactuar con las citoquininas (CKs) y otras fitohormonas (Paul y Foyer, 2001). La absorción y asimilación de N están sujetas a control circadiano a través de la fosforilación (mediada por SnRK1 y otras CDPK, *calcium-dependent protein kinases*) de los transportadores de NO_3^- y NH_4^+ , la NR y la NiR. También otras proteínas del metabolismo de aminoácidos, como la asparagina sintetasa, son inducidas por SnRK1 cuando esta enzima no es inhibida por azúcares. Varias proteínas del metabolismo del N, como la NiR, la GS2 y la Fd-GOGAT, son reguladas por oxidación-reducción mediada por tiorredoxinas (Nunes-Nesi et al., 2010).

1.6. C y N durante el déficit hídrico

Contrario a la predicción de que el déficit hídrico produciría inanición por C, la evidencia indica que existe acumulación de compuestos carbonados. En *Arabidopsis*, se ha observado que la fotosíntesis, especialmente la maquinaria de fijación de C, es resiliente frente a condiciones de estrés severas en tanto que la expansión de las hojas se reduce fuertemente. La actividad de la RubisCO se mantiene, incluso cuando el contenido de agua de las hojas se reduce al 50 %. Incluso en especies cultivables, el mantenimiento de la fotosíntesis durante períodos de sequía en variedades tolerantes está asociado a mayor rendimiento (Boonman et al., 2006; Ma et al., 2016).

Introducción

Durante el déficit hídrico, la demanda de C siempre decae antes que el suministro de C. La acumulación de carbohidratos se ha observado en varias especies, en varias partes de la planta y para diferentes formas de C, solubles y estructurales. Azúcares solubles se acumulan durante el déficit hídrico en maíz (Kim et al., 2000), algodón (Timpa et al., 1986), cebada (Teulat et al., 2001), sorgo (Turner et al., 1978), eucaliptus (Quick et al., 1992), pino (Marron et al., 2003), álamo (Bogeat-Triboulot et al., 2007) y vid (Cramer et al., 2007). Los CNEs también se acumulan en los tallos, las flores, los frutos y la raíz y esta acumulación ocurre en respuesta a choque osmótico o tras restricción hídrica desarrollada lentamente. Los CNEs se acumulan mayoritariamente bajo la forma de hexosas y sacarosa. También existe acumulación de otros compuestos carbonados como azúcares menos abundantes (por ejemplo, trehalosa o manitol), aminoácidos con elevada relación C/N (prolina), o ácido piperídico. Los ácidos orgánicos como el malato, el fumarato o el citrato y compuestos de amonio cuaternario como la glicina-betaina también se acumulan en respuesta al déficit hídrico (Itam et al., 2020). Muchos de estos compuestos son solutos compatibles ya que pueden acumularse en elevadas concentraciones sin perturbar el funcionamiento celular y protegen las estructuras celulares frente a los efectos deletéreos de la pérdida de agua. Debido a que muchos de estos compuestos se acumulan en situaciones de desecación producto de un estrés extremo, su relevancia como característica para mejorar la tolerancia al estrés en cultivos, donde el foco está puesto en el rendimiento y no en la supervivencia, es cuestionable (Muller et al., 2011; Kunert et al., 2020). La glucosa, la sacarosa y sus intermediarios fosforilados, como la glucosa-6-fosfato (G6P) o la trehalosa-6-fosfato (T6P), juegan un rol señalizador que moldea la maquinaria metabólica y de desarrollo mediante el control de la expresión génica y la regulación postraduccional. Estas moléculas integran el metabolismo de C con la señalización durante el estrés. Los azúcares regulan la expresión de cientos de genes involucrados en el control del ciclo celular, proteínas ribosómicas y del metabolismo de t-RNAs entre otros (Muller et al., 2011).

El metabolismo del C y el estrés hídrico se intercomunican a través de rutas que sensan el estado de C. El balance fuente-fosa está finamente controlado por las kinasas SnRK1 (*sucrose-non-fermenting 1-related kinase 1*) y TOR (*target of rapamycin*) (Figura 3) (Wurzinger et al., 2018; Schepetilnikov et al., 2018; Liu and Bassham, 2010). Los niveles de T6P reflejan fielmente el estado de C de la planta. La trehalosa-6-fosfato sintasa 1 (TPS1) convierte G6P y UDP-glucosa en T6P. A pesar de encontrarse en concentraciones submicromolares, la T6P es esencial para el crecimiento vegetativo en *A. thaliana* (Paul et al., 2008). Bajos niveles de C, como se hallan cuando la fotosíntesis es limitada o cuando el crecimiento se dispara, se reflejan en bajos niveles de T6P. Cuando las concentraciones de T6P bajan, SnRK1 reprime a

Introducción

TOR y fosforila otras proteínas como enzimas y TFs que limitan la progresión del ciclo celular y la formación de la pared celular, al mismo tiempo que promueven la fotosíntesis para restaurar los niveles de azúcares. SnRK1 también puede ser inhibida por la G6P y la glucosa-1-fosfato (G1P). De igual forma, cuando se restablecen los niveles de azúcares, la T6P inhibe a SnRK1 y TOR se activa, promoviendo el crecimiento y el desarrollo al activar proteínas asociadas con los ribosomas y la traducción (Lastdrager et al., 2014; Rodrigues et al., 2019; Schepetilnikov et al., 2018). El estado de C también es percibido por la hexoquinasa 1 (HXK1). HXK1 reprime los genes fotosintéticos cuando el estado de C es adecuado y regula la producción de hormonas como auxinas, citoquininas y etileno. Las auxinas y el ABA regulan a su vez las actividades de las kinasas SnRK1 y TOR (Rodrigues et al., 2019).

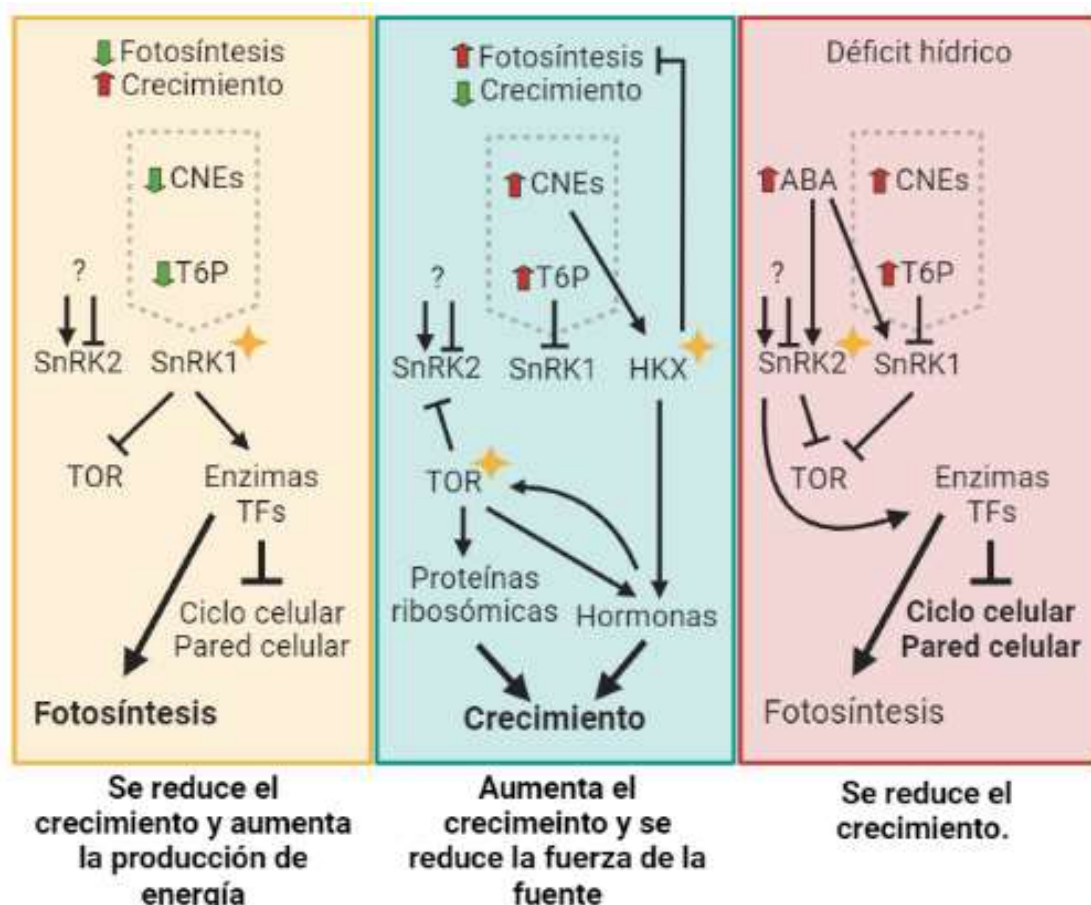


Figura 3. Regulación de la comunicación fuente-fosa por SnRK1 y TOR. SnRK1 y TOR integran la señalización por azúcares y hormonas para mantener el balance entre la fuente y la fosa. A) Una reducción en la fotosíntesis o un crecimiento acelerado producen una disminución de los CNEs, lo que se refleja en un bajo nivel de T6P. SnRK1 está activa, reprime a TOR y fosforila otras proteínas como factores de transcripción y enzimas que enlentecen procesos demandantes energéticamente, como el ciclo celular y la formación de pared celular, e incrementan la producción de energía, potenciando la fotosíntesis. B) Un nivel elevado de CNEs, causado por una alta tasa de fotosíntesis o un crecimiento reducido, produce un aumento del nivel de T6P, que inactiva SnRK1. Esta inactivación causa la activación de TOR que produce la activación de las proteínas ribosómicas y la producción de hormonas que incrementan el crecimiento. Los niveles de CNEs también son sentidos por la hexoquinasa (HXK), que regula la señalización hormonal y reprime los genes fotosintéticos para reducir la

Introducción

fuerza de la fuente. C) Durante el déficit hídrico, la acumulación de ABA activa a SnRK2, que reprime a TOR y modula la apertura estomática y el crecimiento. Adaptado de Rodrigues et al., 2019.

La acumulación de ABA inducido por el déficit hídrico promueve la activación de SnRK1 (Figueroa and Lunn, 2016). El ABA también activa a SnRK2, la cual media las respuestas a la sequía al fosforilar TFs y otras proteínas involucradas en el cierre estomático y el crecimiento. SnRK2 inactiva a TOR bajo condiciones de estrés, en tanto que en ausencia de estrés TOR inactiva a SnRK2. Algunos miembros de la familia SnRK2 actúan independientemente de ABA, integrando otras señales (Yoshida et al., 2016). El ácido salicílico (SA), los brasinosteroides, el ácido jasmónico, las CK y las auxinas, también están implicadas en el control de la actividad de TOR (Rodrigues et al., 2019).

SnRK1 está implicada en la regulación del metabolismo del N. La absorción y asimilación de N están sujetas a control circadiano a través de la fosforilación (mediada por SnRK1 y otras CDPK, calcium-dependent protein kinases) de los transportadores de NO_3^- y NH_4^+ , la NR y la NiR. También otras proteínas del metabolismo de aminoácidos, como la asparagina sintetasa, son inducidas por SnRK1 cuando esta enzima no es inhibida por azúcares. Varias proteínas del metabolismo del N, como la NiR, la GS2 y la Fd-GOGAT, son reguladas por oxidación-reducción mediada por tiorredoxinas (Nunes-Nesi et al., 2010).

1.7. Senescencia

La senescencia es la última etapa del ciclo biológico de las plantas e implica la movilización de la biomasa acumulada durante las etapas de crecimiento vegetativo hacia sus órganos fosa, que pueden ser frutos y semillas en plantas anuales o la raíz o meristemas (u otros órganos) en plantas perennes (Sade et al., 2018a). En varias especies, entre ellas soja, trigo y caña de azúcar, la acumulación de productos fotosintéticos finales (hexosas, almidón y Pi) puede inhibir la fotosíntesis y estimular la senescencia de las hojas (Eom et al., 2015). Asimismo, diversos tipos de estrés ambiental pueden disparar la senescencia prematuramente (James et al., 2019). La senescencia prematura de las plantas es la principal causa de pérdidas en biomasa y en el llenado de grano, debido a la pérdida de capacidad fotosintética. No sólo repercute negativamente sobre el rendimiento y la calidad de las especies cultivables, sino que también es responsable de la corta vida poscosecha de muchos vegetales, frutas y flores; otro factor que contribuye significativamente en las pérdidas globales de alimentos (Gepstein y Glick, 2013; Reguera et al., 2013).

El conjunto de reacciones catabólicas que tienen lugar durante la senescencia, ocurren antes de la muerte celular en todos los órganos, pero es comúnmente aceptado que las hojas son los principales órganos fuente para el llenado de las semillas. La senescencia natural de las hojas es un proceso complejo y

Introducción

organizado (Balazadeh et al., 2008). Dentro de una hoja en senescencia, las células individuales están generalmente en diferentes estadios de senescencia; las células más distales de la hoja envejecen antes y las células que rodean las venas permanecen activas por más tiempo (Buchanan et al., 2005).

En este proceso, ocurre la degradación de la clorofila, de proteínas y de lípidos. La degradación de las proteínas y del mRNA ocurre paralelamente a la pérdida de la capacidad fotosintética. Los ácidos nucleicos, especialmente el RNA, son una fuente importante de fósforo en las hojas maduras. El decaimiento del RNA ocurre rápidamente durante la senescencia, mientras que el DNA nuclear es mantenido para permitir que la expresión génica continúe. Las membranas celulares se degradan, hecho que afecta la estructura y el funcionamiento celular. Las membranas de los tilacoides son una fuente de C muy abundante que se remobiliza durante la senescencia. El N está principalmente bajo la forma de proteínas, por lo que pasos de proteólisis son fundamentales para la removilización (James et al., 2019). Varios genes vinculados a la degradación de proteínas se inducen, entre ellos, proteínas con F-box, proteínas con dominios RING y otros miembros del complejo ubiquitina ligasa. También proteasas de cisteína, de serina, de aspartato y proteasas vacuolares se acumulan (Buchanan et al., 2005). Muchas de estas reacciones proteolíticas implican la participación de varias rutas vesiculares que participan en la degradación de componentes celulares o en la movilización de estos componentes hacia la vacuola para que ocurra su degradación (Buchanan et al., 2005; Breeze et al., 2011; Xie et al., 2015). La movilización de N es acompañada por un aumento de las enzimas del metabolismo de aminoácidos, en particular del metabolismo del glutamato/glutamina y de ureidos (Buchanan et al., 2005). En la misma línea, varios transportadores de azúcares, de aminoácidos y de péptidos aumentan su expresión (Buchanan et al., 2005). Además de cambios en la actividad de proteasas, el aumento en la degradación de proteínas puede relacionarse a una disminución en la abundancia de inhibidores de proteasas (Buet et al., 2019). Las serpinas pueden ser inhibidores clave de proteasas asociadas a senescencia, como RD21 y también metacaspasas, involucradas en la muerte celular programada (Cohen et al., 2019). Los inhibidores tipo kunitz y las cistatinas también disminuyen durante la senescencia (Tajima et al., 2011).

Otro grupo de genes que incrementa su expresión durante la senescencia son los genes de degradación de la clorofila. El gen SGR1 (STAY GREEN) regula el primer paso de desmantelamiento de la clorofila. SGR1, SGR2, NYC (clorofila-b-reductasa) y PaO (feoforbido-a-oxigenasa) incrementan su expresión durante la senescencia. La degradación de la clorofila es un proceso fundamental para que los *light harvesting complexes*, la segunda fuente más abundante de N cloroplástico, puedan ser reciclados (Kuai et al., 2018).

Introducción

La etapa culminante del proceso de senescencia es la muerte celular programada (PCD, *programmed cell death*). Para optimizar el reciclaje de nutrientes, la PCD está finamente controlada y ocurre una vez que la mayoría de los nutrientes ya han sido recuperados (Olivera-Carrillo et al., 2015). Durante esta etapa, la señalización por etileno cumple un rol esencial (Daneva et al., 2016). El colapso controlado de la vacuola y la degradación escalonada del DNA (*DNA laddering*) son característicos de la PCD. No obstante, el *DNA laddering* raramente ocurre durante la senescencia y el colapso vacuolar sólo se observa en las etapas finales de la misma (Buchanan et al., 2005).

1.8. Control hormonal de la senescencia

Se ha demostrado la participación de muchas hormonas en senescencia natural o desencadenada frente a distintas condiciones (Huang et al., 2008; Todaka et al., 2017). Las citoquininas (CK) son hormonas que controlan muchos procesos fisiológicos y de desarrollo incluyendo la división celular, la formación y la protección de las estructuras celulares (como los meristemas apicales), el desarrollo floral y el desarrollo de los cloroplastos. A su vez, regulan el comportamiento estomático, la activación de la síntesis proteica y controlan la movilización de nutrientes, afectando la senescencia de los órganos o de la planta entera (Gepstein y Glick, 2013). Cuando la senescencia comienza, los niveles endógenos de CK caen, pero la aplicación exógena de CK puede retrasar dramáticamente la senescencia (Noodén et al., 1979; Badenoch-Jones et al., 1996). Varios genes que regulan la respuesta a CK (ARR4, 6, 7 y 9) y los genes de biosíntesis IPT y CK sintasa reducen su expresión mientras que genes de degradación de CK (CK oxidasa) la incrementan (Buchanan et al., 2005).

Paralelamente, aumentan genes de biosíntesis de ABA (NCED y AAO1 y 3) (Buchanan et al., 2005). El ácido abscísico (ABA) cumple una función central en las respuestas al déficit hídrico en plantas. En estas condiciones, el ABA se acumula y estimula la senescencia de las hojas y la disminución del contenido de clorofilas a través del control de la transcripción de genes nucleares y cloroplásticos con roles en la senescencia (Sade et al., 2018a). A su vez, el estrés hídrico provoca una reducción de las CK, lo que desencadena una mayor sensibilidad a concentraciones crecientes de ABA. Esto promueve la senescencia de las hojas y su abscisión, contribuyendo a la disminución del follaje y de la pérdida de agua (Ha et al., 2012). Asimismo existe una conexión directa entre la regulación del cierre estomático y la senescencia de las hojas. La fosfatasa SAG113, localizada en el aparato de Golgi e inducida por ABA y senescencia, funciona como un regulador negativo de la señalización por ABA y suprime el cierre estomático, lo que provoca la desecación de las hojas senescentes (Zhang y Gan, 2012).

Introducción

Por su parte, el etileno está involucrado en la germinación, la floración, el desarrollo de las frutas y en ciertas respuestas de defensa y tiene numerosas interacciones con otras hormonas vegetales. En general, los niveles de etileno en las plantas son bajos, pero su síntesis aumenta considerablemente durante la senescencia y la maduración de las frutas. Elevados niveles de etileno también puede producirse durante varios tipos de estrés biótico y abiótico, profundizando los efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la planta (Stepanova y Alonso, 2005).

Las auxinas juegan un rol relevante en el desarrollo de las flores, las hojas, el tejido vascular y durante la embriogénesis (Cheng et al., 2006; 2007; Stepanova et al., 2008). La estrecha relación de las auxinas con el etileno es de las interacciones entre hormonas establecidas con mayor claridad. Las auxinas estimulan la síntesis de etileno al promover la transcripción de las enzimas involucradas en su síntesis. Estudios sobre la elongación de la raíz permitieron determinar que el etileno también induce la producción de auxina, la cual potencia la senesibilidad de las células a los efectos inhibitorios del etileno sobre el crecimiento en la zona de elongación (Stepanova et al., 2005). Dicho de otra forma, la acumulación de cierto nivel umbral de auxina es necesaria para que la señalización del etileno ocurra adecuadamente (Stepanova y Alonso, 2019). Muchos genes de síntesis y respuesta a auxina modulan su expresión durante la senescencia (Buchanan et al., 2005; Balazadeh et al., 2008; Breeze et al., 2011). Durante la senescencia de la soja, las auxinas promueven la acumulación de la kinasa GmSARK, cuya expresión ha sido asociada a la acumulación de genes de síntesis y de señalización de etileno, por lo que las auxinas cumplen un rol en la senescencia, acelerándola (Xu et al., 2011; Mueller-Roeber y Balazadeh, 2014).

Asimismo, las auxinas tienen numerosas interacciones con las CK, tanto antagónicas como sinérgicas, para generar y mantener patrones de diferenciación celular, lo que ha sido estudiado en profundidad durante el desarrollo del meristema apical de la raíz, el meristema apical del tallo, el gineceo y en diferentes ejemplos de cultivo de tejidos (Schaller et al., 2015). Sin embargo, una vez que los órganos se han establecido, las funciones de estas dos hormonas son fundamentalmente antagónicas. El efecto principal es sobre el balance entre la raíz y la parte aérea de la planta: la auxina promueve el desarrollo de raíces laterales y el crecimiento de la raíz e inhibe el crecimiento de la parte aérea al interferir con la señalización de las CK (Moubayidin et al., 2009; Naseem y Dandekar, 2012; Kurepa et al., 2019). Esta interacción cumple un rol importante en la adaptación de las plantas a condiciones de sequía y privación de nutrientes minerales (Kurepa y Smalle, 2022).

Introducción

La señalización mediada por ácido salicílico (SA) es específica de la senescencia natural. Los niveles de SA son elevados en hojas inmaduras, decrecen gradualmente durante la madurez y luego incrementan nuevamente durante la senescencia (Breeze et al., 2011). El SA actúa sinérgicamente con el etileno para promover la expresión de factores de transcripción y otros genes asociados a senescencia (SAGs) (Rivas-San Vicente y Plasencia., 2011; Wang et al., 2021).

1.9. Retraso de la senescencia como estrategia para mejorar los cultivos

Como se mencionó, la abscisión de las hojas y la senescencia acelerada son parte de las estrategias de “escape” del estrés. Estas respuestas tienen un rol importante en la naturaleza, ya que permiten la reducción del follaje y la supervivencia de la siguiente generación mediante la producción de semillas durante situaciones de estrés. Sin embargo, en los cultivos anuales la senescencia prematura puede generar pérdidas de rendimiento significativas. Por este motivo, interferir con las respuestas de escape durante la senescencia inducida por estrés, mediante el mantenimiento de la estabilidad de la fuente (asimilación de C y N) y/o la manipulación de las relaciones fuente-fosa (el reparto de C y N), es considerado una estrategia atractiva para generar cultivos más resistentes a las condiciones ambientales adversas (Sade et al., 2018a).

Tanto la senescencia como las respuestas adaptativas al estrés ambiental involucran la señalización por especies reactivas del oxígeno (ROS) que regulan estos procesos en forma integrada con las hormonas (Foyer et al., 2012; Meyer et al., 2007; Noctor et al., 2002, 2014). Un número considerable de factores de transcripción de la familia NAC juegan un rol importante en el desencadenamiento de la senescencia, acoplándola con la señalización por ROS (Balazadeh et al., 2010; Oda-Yamamizo et al., 2016; Yang et al., 2011). JUB1, un factor de transcripción de la familia NAC inducido por H₂O₂, es un regulador central de la longevidad en *Arabidopsis*. La sobreexpresión de JUB1 retrasa la senescencia e incrementa la tolerancia a varios tipos de estrés abiótico. Las plantas que sobreexpresan JUB1 muestran un aumento de genes de respuesta a ROS como HSPs y GSTs (Gepstein et al., 2013; Wu et al., 2012). Algunos mutantes KO en factores de transcripción NAC exhiben senescencia retardada y mayor resistencia al déficit hídrico (Lee et al., 2012). Por otra parte, la sobreexpresión de algunos factores de transcripción NAC también causa un fenotipo de senescencia retardada (Yang et al., 2011) o acelerada (Mendes et al., 2013; Pimenta et al., 2016). Estos ejemplos muestran cómo la alteración de reguladores centrales de la senescencia puede tener efectos pleiotrópicos cuyos fenotipos dependen de la especie.

Introducción

La degradación de la clorofila es normalmente empleada como un marcador visual de la progresión de la senescencia. El ejemplo más extremo de retraso en la senescencia es el de algunas plantas con fenotipos “*Stay Green*” - quiere decir, plantas que presentan un bloqueo total o parcial en la degradación de la clorofila. Sin embargo, muchas plantas con fenotipo *Stay Green* no parecen tener alteraciones importantes en el desarrollo de la senescencia, sino que éstas serían de carácter “cosmético” ya que aunque la degradación de la clorofila está impedida, existe una caída en los parámetros fotosintéticos indicando que la senescencia ocurre (Thomas y Howarth, 2000).

En soja, aunque varios factores de transcripción y genes que participan en la senescencia, removilización de nutrientes, señalización y metabolismo oxidativo han mostrado tener contribución a fenotipos *Stay Green* (Wang et al., 2020), dos *loci* nucleares recesivos (llamados d1 y d2) y un locus citoplasmático dominante (llamado *cytG*) han sido los más caracterizados. Los alelos d1 y d2 fueron caracterizados como mutaciones sobre los genes *GmSGR1* y *GmSGR2*, ortólogos a los genes SGR/NYE de *Arabidopsis*, los cuales codifican para Mg-dequelatasas, fundamentales en el primer paso de la degradación de la clorofila a (Nakano et al., 2014; Li et al., 2017). La secuenciación del genoma cloroplástico de variedades de soja con cotiledones y cubierta verdes permitió identificar que el alelo *cytG* (de ahora en más G) es causado por una inserción de 5 bp en *psbM*, una subunidad pequeña del fotosistema II implicada en la degradación de la clorofila b (Kohzuma et al., 2017). La presencia del alelo G dentro de una población de NILs (*Near-Isogenic Lines*) de la variedad Clark produce un fenotipo *Stay Green* leve, en el que se retiene la clorofila y las proteínas LHC asociadas al fotosistema II, pero donde la RubisCO y otras proteínas solubles eventualmente son completamente degradadas (Guiamet et al., 1991; Kohzuma et al., 2017). Por otra parte, los alelos d1 y d2 en homocigosis, con o sin la presencia del alelo G, (plantas d1d1d2d2 y GGd1d1d2d2 - de forma abreviada, d1d2 y Gd1d2) no mostraron degradación de clorofila (Guiamét y Giannibelli, 1996) ni alteración de la ultraestructura de sus cloroplastos (Guiamét y Giannibelli, 1994). Sus membranas tilacoidales externa e interna y sus granas se mantuvieron intactas en tratamientos de privación de luz o durante tratamientos que aceleran la senescencia (ABA, metil jasmonato, etileno) (Guiamét y Giannibelli, 1994). La combinación con el alelo G además, retrasa la caída de la fotosíntesis e interfiere con la degradación de la RubisCO y de otras proteínas solubles (Guiamét y Giannibelli, 1996). En poblaciones de NILs de la variedad Clark y Harosoy, las combinaciones d1d2 y Gd1d2 produjeron una retención del 50 % de la proteína soluble en las hojas en abscisión en comparación con solo un 10 % de proteína retenida en las variedades no *Stay Green* (Guiamét y Giannibelli, 1996). Además de estas alteraciones sobre la movilización de proteínas, las plantas d1d2 mostraron una caída en su germinación y defectos en el

Introducción

desarrollo tras la germinación, como ser el fenotipo albino de sus cotiledones y alteraciones en la elongación de la raíz, debido a un aumento del fotodaño al ser expuestas a luz durante 30 días (Li et al., 2017). Estos efectos representan una desventaja desde el punto de vista de la relocalización de nutrientes y la vida poscosecha.

Son pocos los ejemplos mediados por transgénesis que han demostrado ser efectivos en retrasar la senescencia inducida por estrés generando un fenotipo *Stay Green* en condiciones de estrés (Kusaba et al., 2013). Quizás el ejemplo más impactante es el de plantas que expresan la isopentenil transferasa (IPT), enzima clave para la síntesis de CK, bajo el control de promotores inducibles por senescencia. Este efecto se ha demostrado en tabaco (Rivero et al., 2007; Reguera et al., 2013), arroz (Peleg et al., 2011; Sade et al., 2018), algodón (Kuppu et al., 2013), maíz (Décima Oneto et al., 2016) y trigo (Beznec et al., 2021; Gomez Mansur et al., 2021).

Sin embargo, en relación al rendimiento, el retraso de la senescencia puede tener efectos contrapuestos según la especie. Por ejemplo, en tabaco, una mayor longevidad de las hojas resulta en mayor producción de biomasa y rendimiento bajo condiciones normales de crecimiento (Madoka et al., 2002) y en condiciones de restricción hídrica severas (Rivero et al., 2007). Por el contrario, en trigo y arroz, donde el llenado efectivo de los granos culmina antes que la senescencia de las hojas, un retraso de la senescencia, esto es, una menor removilización de C y N, puede reducir el índice de cosecha y la tasa de llenado de grano (Gong et al., 2005; Chang et al., 2017).

El concepto general es que un fenotipo de senescencia retrasada por sí solo no es suficiente para mejorar el rendimiento y la tolerancia al estrés ambiental. Es necesario tener en cuenta cómo son las prácticas de crecimiento del cultivo en particular. En el caso de la soja, lo deseable es que la planta logre alcanzar la máxima acumulación de biomasa posible pero que ésta pueda movilizarse hacia las semillas en el momento adecuado y en la proporción adecuada. La pregunta es entonces, ¿cómo conseguir plantas que presenten una senescencia inducida por estrés retrasada independientemente de un fenotipo *Stay Green* y en donde la senescencia natural se encuentre inalterada?

1.10. Antecedentes para la selección de los genes CV

En un trabajo previo, nuestro grupo analizó las respuestas fisiológicas y moleculares de dos genotipos de soja con fenotipos de respuesta a estrés hídrico contrastantes. Uno de estos genotipos, el N7001, es un cultivar que exhibe el rasgo de marchitamiento lento (Gallino et al., 2018a) y presenta estabilidad de rendimiento en una variedad de años y locaciones. El otro genotipo, el TJS2049 es altamente sensible al déficit hídrico (Pardo et al.,

Introducción

2014). La comparación de los transcriptomas de estos dos genotipos en condiciones de déficit hídrico, permitió la identificación de genes diferencialmente expresados (Gallino et al., 2018a). Entre ellos, genes ortólogos al marcador autofágico ATG8, la proteasa inducida por senescencia SAG12 y el gen de vesiculación cloroplástica CV. Estos genes participan dentro de un conjunto de rutas vesiculares de degradación de componentes celulares (Figura 4).

Dentro de estos mecanismos, la autofagia es el más estudiado. En la microautofagia, pequeñas vesículas citosólicas son engullidas por invaginaciones del tonoplasto formando pequeñas vesículas intravacuolares que son degradadas por hidrolasas vacuolares (Klionsky and Oshumi, 1999). En la macroautofagia (de ahora en más, autofagia), componentes citosólicos son engullidos por una estructura especializada de doble membrana, el autofagosoma, que lleva los componentes reciclables hacia la vacuola (Xie et al., 2015). El reciclaje autofágico ocurre por el secuestro de material citoplásmico en el autofagosoma. Estudios en levadura, y más adelante, en plantas y animales, permitieron definir un conjunto de proteínas relacionadas a la autofagia (ATG) que dirigen el proceso en respuesta a factores internos y externos. Entre estas proteínas, hay factores que reclutan membranas hacia el fagoforo (autofagosoma en formación), que reclutan el cargo adecuado, cierran el fagoforo para formar el autofagosoma y llevan el autofagosoma a la vacuola central. Estos componentes centrales incluye el complejo kinasa ATG1, el cual responde a señales nutricionales mediadas por TOR y otras kinasas, el complejo transmembrana ATG2/9/18, que provee de membranas al fagoforo, el complejo fosfatidil inositol-3 (PI3) kinasa ATG6/VPS34 (*vacuolar protein sorting-associated protein 34*)/ATG14/VPS15, que asiste en la nucleación del fagoforo, y el conjunto de conjugación ATG8/ATG12, que promueve la captura del cargo, la expansión y cierre de la vesícula y la fusión de los autofagosomas con la vacuola. El contenido incluye mitocondrias no deseadas o dañadas (mitofagia; Li et al., 2014), cloroplastos (clorofagia; Ishida et al., 2008), peroxisomas (peroxifagia; (Farmer et al., 2013; Kim et al., 2013; Shibata et al., 2013), grandes complejos proteicos como ribosomas (ribofagia; Hillwig et al., 2011) y proteasomas (proteafagia; Marshal et al., 2015) o agregados proteicos insolubles (agrefagia; Zhou et al., 2013). En animales, incluso patógenos pueden ser incorporados (xenofagia; Gutierrez et al., 2004; Nakagawa et al., 2004). Masas de citoplasma también pueden ser engullidas indiscriminadamente si la disponibilidad de nutrientes es limitante (Li et al., 2015). La autofagia también está implicada en la entrega nocturna de almidón hacia la vacuola a través de pequeñas estructuras granulares, denominadas SSGs (*small starch granules like structures*), un proceso que no necesariamente está asociado con el estrés (Wang et al., 2013).

Introducción

ATG8 y ATG12 son dos proteínas con similitud con la ubiquitina, activadas por una cascada de conjugación llevada adelante por ATG7, una enzima activadora E1 ATP-dependiente, ATG3 y ATG10, dos enzimas activadoras E2. ATG12 activada se une covalentemente a ATG5. El aducto ATG12-ATG5 se asocia luego a ATG16, y este complejo adquiere la actividad ligasa necesaria para acoplar la fosfatidiletanolamina (PE) a la glicina C-terminal de ATG8. El aducto ATG8-PE recubre a los fagoforos en expansión y sirve como una plataforma para muchos receptores autofágicos que reclutan el cargo adecuado y para factores que promueven el cierre de la vesícula y la fusión con el tonoplasto (Li and Vierstra, 2012; Kilonsky and Schuman, 2014; Rogov et al., 2014).

Los receptores involucrados tienen dominios de unión al cargo y de interacción con ATG8-PE (Wang et al., 2017). Entre ellos se encuentran las proteínas NBR1 (*Next to BRCA1 gene 1*) en plantas y animales, p62/SEQUESTOSOME1 en mamíferos y las proteínas Cue5/Tollip en levadura, que unen agregados ubiquitinados; ATG30 y ATG36 en levadura participan en la peroxifagia; BCL2/*Adenovirus E1B 19-kD-interacting protein 3* participa en la mitofagia y las proteínas *Tryptophan-rich Sensory Protein*, *ATG8-Interacting Protein 1* y RPN10 (Regulatory Particle non-ATPase 10) identifican porfirinas libres, proteínas cloroplásticas y proteasomas inactivados, respectivamente (Svenning et al., 2011; Vanhee et al., 2011; Zientara-Rytter et al., 2011; Liu et al., 2012; Michaeli et al., 2014; Rogov et al., 2014; Marshall et al., 2015). La maquinaria autofágica participa en la movilización de la RubisCO desde los cloroplastos hacia la vacuola en vesículas denominadas RCBs (*RubisCO-containing bodies*; Chiba et al., 2003; Izumi and Ishida, 2011).

Un segundo mecanismo de degradación de proteínas cloroplásticas es mediado por las vesículas asociadas a senescencia (SAVs, *Senescence Associated Vacuoles*). Mientras que los autofagosomas se encuentran en hojas y en raíz, las SAVs participan como mecanismo de degradación solamente en células que contienen cloroplastos (Otegui et al., 2005). Al igual que los RCBs, las SAVs contienen proteínas cloroplásticas como la RubisCO y la GS2 (Martínez et al., 2008). Las SAVs son sitios de degradación de proteínas cloroplásticas al contener elevada actividad proteolítica; las SAVs no son vesículas de transporte sino que son compartimentos líticos en sí mismas. Estas vesículas contienen la proteasa de cisteína SAG12 (*senescence-associated gene 12*), entre otras proteasas (Otegui et al., 2005; Buet et al., 2019). SAG12 es la única SAG cuya expresión está exclusivamente controlada por senescencia natural, por lo que la degradación mediada por SAVs tiene asignado un rol específico durante este tipo de senescencia (Masclaux-Daubresse et al., 2010).

Introducción

Las SAVs son acídicas, pero tienen un pH diferente respecto a la vacuola central lo que podría permitir el funcionamiento de diferentes proteasas en diferentes compartimentos además de representar un ahorro energético al mantener un pH más bajo en un compartimiento más pequeño que la vacuola central (Martínez et al., 2008). Las SAVs tienen H⁺ pirofosforilasa vacuolar pero no tiene la acuaporina de la vacuola central TIP gama, lo que indica que las SAVs no se originan de la vacuola. Las SAV continúan formándose en mutante *atg7* de autofagia lo que indica que a diferencia de la formación de RCBs la formación de SAVs no requiere una autofagia funcional (Otegui et al., 2005).

Las SAVs tienen un elevado contenido de la subunidad grande la RubisCO y GS2, indicando que participan en la degradación de proteínas del estroma, y también algunas proteínas tilacoidales, como PsaA y Lhcas, pero no contienen proteínas del PSII, como D1 o proteínas de la antena del PSII (LHCII, Martínez et al., 2008; Gomez et al., 2019). Además de participar en la degradación de proteínas, las SAVs participan en la degradación de la clorofila durante la senescencia. A diferencia del proceso de degradación de proteínas, el cual provee N para la removilización hacia otras partes de la planta, la clorofila es degradada en catabolitos nitrogenados que son eventualmente almacenados en la vacuola bajo una forma no removilizable (Hortensteiner, 2006; Kuai et al., 2018). El proceso de removilización de la clorofila se trata de un proceso de detoxificación, para evitar el potencial riesgo fototóxico como consecuencia del desmantelamiento de los complejos clorofila-proteína y la liberación de clorofila libre o catabolitos derivados de la clorofila (Gomez et al., 2019). Algunas enzimas que participan de la degradación de la clorofila, como la clorofilasa, que participa en el primer paso de la degradación de la clorofila, o la clorofila desfitasa, involucrada en la remoción de la cadena de fitol, no participan activamente durante la degradación de la clorofila durante la senescencia (Shenk et al., 2007; Lin et al., 2016). Las SAVs contienen clorofila y son competentes para realizar pasos tempranos de la degradación (Gomez et al., 2019)

Otros dos tipos de vesículas de tráfico de proteínas cloroplásticas han sido caracterizadas. La proteína ATI1 (*ATG8-interacting protein 1*) participa en el tráfico vesicular desde el ER (Honig et al., 2012) y los cloroplastos (Michaeli et al., 2014) hacia la vacuola central. ATI1 puede ser detectada dentro de los plástidos y también en el citosol, asociada con vesículas (*ATI-plastid associated bodies*, ATI1-PS) que contienen GFP de localización cloroplástica. La formación de ATI-PS no necesita de una maquinaria autofágica funcional pero la internalización en la vacuola central sí lo requiere (Michaeli et al., 2014). ATI1 interactúa con varias proteínas cloroplásticas, muchas localizadas en los tilacoides. Entre ellas, varias están involucradas en la fotosíntesis: LHCA4, PsbS, PrxA, FNR1, APE1 (Michaeli et al., 2014).

Introducción

La ruta de degradación más recientemente descrita por Wang y Blumwald (2014) involucra un gen, denominado CV (*chloroplast vesiculation*), el cual participa en la senescencia natural y la senescencia inducida por estrés abiótico. Esta proteína fue identificada inicialmente en plantas transgénicas de arroz que expresan la construcción pSARK-IPT y presentan, por lo tanto, un contenido elevado de CKs. La proteína CV se localiza en los cloroplastos donde interactúa con otras proteínas principalmente tilacoidales. CV causa la formación de vesículas dentro del cloroplasto, llamadas CCVs (*CV containing vesicles*), que se desprenden del cloroplasto y se movilizan hacia la vacuola central. La sobreexpresión constitutiva de CV es letal, pero la sobreexpresión inducible de CV promueve la formación de CCVs y acelera la senescencia, afectando el contenido de proteínas de los fotosistemas (PsaB, PsaA, PsbO) y del estroma (GS2). Por otra parte, el silenciamiento de CV promueve la estabilidad cloroplástica y retrasa la senescencia inducida por estrés. La ruta de degradación mediada por CV es independiente de la autofagia, al permanecer activa en mutantes *atg5*. Asimismo, la proteína CV contiene un péptido de localización cloroplástica y solamente parece estar vinculado al cloroplasto y a las CCVs. ATI1, en cambio, está implicada en otros procesos celulares ya que se encuentra también en cuerpos asociados al ER que son transportados a la vacuola (Honig et al., 2012).

Se desprenden de esta revisión algunos puntos que hacen que la ruta de degradación mediada por CV sea atractiva para llevar adelante estrategias de edición génica. Primero, es aparentemente la ruta que participa en la degradación de los cloroplastos de forma más específica, por lo que no se espera que su eliminación tenga efectos pleiotrópicos sobre el reciclaje de otros componentes celulares. También es esperable que al no presentar interacciones con las otras rutas de degradación, que la senescencia natural continúe con su progresión normal. A diferencia de la autofagia o de la degradación mediada por ATI, no se ha observado un fenotipo de senescencia acelerada en las plantas de *Arabidopsis* o arroz que presentan silenciada la expresión de CV. En estas plantas, tampoco se ha observado un impacto negativo sobre el rendimiento. Sin embargo, esto no garantiza que la eliminación del gen no pueda tener un impacto sobre el rendimiento en soja puesto que el reciclaje de N presenta diferencias importantes respecto al arroz. Por este motivo, este es uno de los aspectos fundamentales a evaluar en plantas *knock-out*.

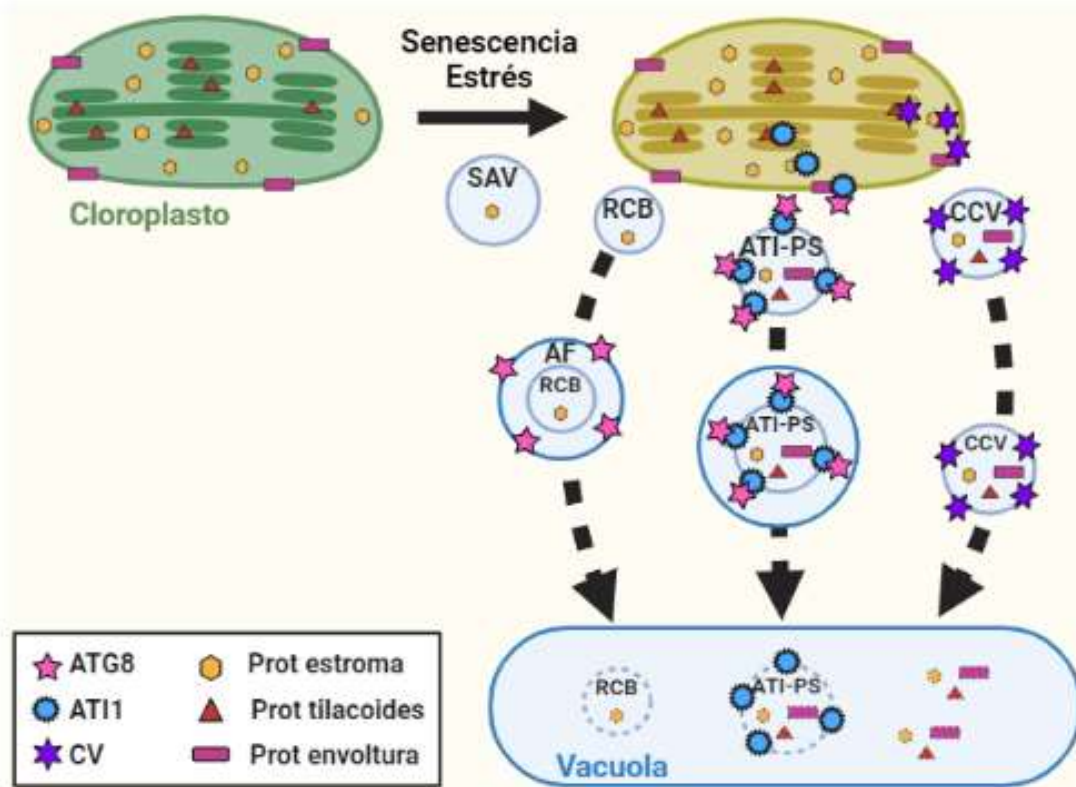


Figura 4. Rutas vesiculares de degradación de proteínas cloroplásticas. Bajo condiciones de estrés o durante la senescencia, las proteínas cloroplásticas pueden degradarse mediante cuatro rutas. A) Proteínas del estroma son importadas dentro de pequeñas vacuolas asociadas a senescencia (SAV), las cuales tienen actividad proteolítica. B) AT11 interactúa con proteínas cloroplásticas formando vesículas ATI-PS o C) proteínas del estroma son importadas dentro de RCB (*RubisCO containing bodies*). Estas vesículas son transportadas a la vacuola para su degradación mediante la maquinaria autofágica. D) CV produce la generación de vesículas CCV (*CV-containing vesicles*) a partir de membranas cloroplásticas que son transportadas hacia la vacuola. Cada una de las rutas transporta proteínas específicas: RubisCO para las SAV y RCB; ciertas proteínas tilacoidales para ATI-PS y CV.

2. Objetivo general e hipótesis de trabajo

El objetivo general de este trabajo es caracterizar nuevos componentes que participan en los mecanismos de respuesta a la sequía en plantas y aportar herramientas para la manipulación genética de la soja mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9.

Se parte de la premisa de que la senescencia inducida por estrés tiene un efecto negativo en la productividad de los cultivos y que, por lo tanto, la alteración de esta respuesta puede incrementar el rendimiento de soja en condiciones de estrés. Durante la senescencia, la degradación de los cloroplastos es un evento temprano. La degradación de estos organelos resulta

Introducción

en la movilización del N y C hacia órganos fosa, como las semillas. Sin embargo, una degradación cloroplástica prematura puede afectar la capacidad fotosintética y comprometer el rendimiento de un cultivo. Los trabajos del grupo del Dr. Eduardo Blumwald (Universidad de California, Davis) han demostrado que mejorar la estabilidad cloroplástica en condiciones de estrés es una buena estrategia para retrasar la senescencia inducida por estrés (Rivero et al., 2007; Peleg et al., 2011; Reguera et al., 2013).

En este sentido, aquí se aborda el estudio de una proteína que participa en el reciclaje de proteínas cloroplásticas durante la senescencia natural e inducida por estrés, denominada CV (*Chloroplast Vesiculation*). Esta proteína fue caracterizada por el grupo de E. Blumwald en el organismo modelo *Arabidopsis thaliana* y en arroz (Wang y Blumwald, 2014; Sade et al., 2018). La soja presenta dos genes ortólogos a *AtCV*. En este trabajo se plantea realizar el estudio funcional de los genes CV de soja y explorar herramientas para la generación de plantas de soja presentando alteraciones en la expresión de estos genes.

3. Hoja de ruta

En el capítulo 1, se describen los cambios transcripcionales que ocurren en soja durante la senescencia inducida por estrés. Asimismo, se analiza la participación de las diferentes rutas vesiculares de degradación de componentes celulares, con énfasis en la ruta de CCV (*CV Containing Vesicles*). Se observan las diferencias en los perfiles de expresión temporal y espacial para los dos genes de soja (*CV1* y *CV2*) y se sugiere una especialización funcional para los dos miembros de esta familia de genes.

En el capítulo 2, se describen las herramientas moleculares generadas para obtener plantas de soja con expresión modulada de los genes CV, y se describen los procedimientos empleados para abordar la generación de mutantes de tipo *knockout* de estos genes mediante edición génica.

4. Capítulo 1: Estudio de la ruta de vesiculación cloroplástica de soja durante la senescencia inducida por estrés

4.1. Objetivos:

1. Identificar genes blanco para incrementar la tolerancia a sequía en soja mediante estrategias de edición génica.

Introducción

2. Evaluar la participación de las rutas vesiculares de degradación de cloroplastos en respuestas de senescencia inducida por estrés hídrico en soja.
3. Caracterizar el rol de los genes *CV* en la respuesta al estrés hídrico en dos genotipos de soja contrastantes en su fenotipo frente a sequía.

4.2. Resumen del manuscrito en español:

La soja es la leguminosa cultivada de mayor importancia a escala global. El desarrollo de cultivares con fenotipos de alto rendimiento junto con resistencia a la sequía, ha planteado grandes desafíos. En este estudio, analizamos la contribución de genes clave involucrados en la degradación de los cloroplastos inducida por estrés, en las respuestas de dos cultivares de soja que exhiben fenotipos contrastantes en condiciones de déficit hídrico.

Nuestros resultados muestran una correlación negativa entre la tolerancia a la sequía y la expresión de genes que codifican proteínas de vesiculación cloroplástica (CV), y destacan el papel de la ruta vesicular mediada por CV en el control de la senescencia inducida por estrés en la soja. Las proteínas CV han sido previamente caracterizadas en *Arabidopsis* y arroz, evidenciando su participación en una vía vesicular específica de la degradación de los cloroplastos durante la senescencia natural e inducida por estrés. El genoma de la soja contiene dos genes parálogos que codifican dos proteínas CV muy similares, denominadas CV1 y CV2. En este trabajo, mediante la sobreexpresión condicional de una fusión CV2-FLAG, pudimos confirmar el papel de CV2 en la degradación de proteínas cloroplásticas.

Para explorar la especialización funcional de estos genes, analizamos la actividad transcripcional de los genes *CV* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el gen reportero GUS bajo el control de secuencias promotoras de CV1 o de CV2. El promotor CV1 respondió principalmente a estímulos abióticos, como tratamiento hiperosmótico, salinidad y estrés oxidativo, mientras que el promotor CV2 presentó mayor actividad durante la senescencia natural. Asimismo, la actividad de los promotores difirió sustancialmente en la respuesta a fitohormonas. Si bien ambos promotores pudieron dirigir la expresión de GUS en respuesta al tratamiento con auxinas, solo el promotor CV1 se activó específicamente en respuesta a hormonas relacionadas con el estrés, como ABA, ácido salicílico y metil jasmonato. Además, la expresión inducida por oscuridad de CV2, y no de CV1, fue fuertemente inhibida por citoquininas, de forma similar a lo reportado para los genes *CV* de *Arabidopsis* y arroz. La expresión de los genes *CV* en los tejidos de la raíz, sugiere un papel para las proteínas CV en la removilización de N de los plástidos de la raíz durante el desarrollo, así como en condiciones de estrés.

Introducción

Estos resultados indican roles diferenciales para los genes *CV1* y *CV2* durante el desarrollo y en condiciones de estrés ambiental, y apuntan a *CV1* como un blanco interesante para llevar adelante estrategias de edición génica para aumentar la tolerancia a la sequía mediante la manipulación de la senescencia inducida por estrés, sin comprometer la senescencia natural.

5. Manuscrito 1

TITLE: Functional specialization of chloroplast vesiculation (CV) duplicated genes from soybean shows partial overlapping roles during stress-induced or natural senescence.

AUTHORS: Fleitas AL¹, Castro A¹, Blumwald E², Vidal S¹.

¹ Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

² Department of Plant Sciences, University of California, Davis, California 95616

ABSTRACT:

Soybean is a globally important high-value legume crop but is highly sensitive to drought stress. Breeding soybeans to improve drought tolerance in conjunction with high yield, has posed major challenges. In this study, we investigated the contribution of key genes involved in the stress-induced chloroplast degradation, to the responses of two soybean cultivars exhibiting contrasting phenotypes upon water deficit.

Our results indicate a clear negative correlation between drought tolerance and the expression of genes encoding chloroplast vesiculation (CV) proteins, and highlight the role for the CV vesicular pathway in the control for stress-induced senescence in soybean. CVs have been previously characterized in *Arabidopsis* and rice as proteins that participate in a specific chloroplast-degradation vesicular pathway during natural and stress-induced senescence. Soybean genome contains two paralog genes encoding for two highly similar CV proteins, named CV1 and CV2. Here, we could confirm the role of CV2 in chloroplast degradation, by analyzing the effect of conditional overexpression of CV2-FLAG fusions on the accumulation of specific chloroplast proteins.

To explore the functional specificity of these genes, we analyzed their specific promoter activities in transgenic *Arabidopsis* plants expressing the GUS reporter gene under the control of CV1 or CV2 promoter sequences. CV1 promoter responded primarily to abiotic stimuli, such as hyperosmotic conditions, salinity and oxidative stress, while CV2 promoter was active during natural senescence. In addition, promoter activities differed substantially in their response to hormones. While both CV1 and CV2 promoters were able to direct GUS expression in response to auxin treatment, only CV1 promoter was specifically activated in response to stress-related hormones such as ABA,

salicylic acid and methyl jasmonate. Moreover, the dark-induced expression of CV2, but not of CV1, was strongly inhibited by cytokinin, similar to the reported gene expression of Arabidopsis and rice CV genes. We also report the expression of CV genes in root tissues suggesting a role for CVs in N remobilization from root plastids during development as well as under stress conditions.

Together, these results indicate differential roles for these genes during development and environmental stress conditions, and point to CV1 as an interesting target for gene editing to increase drought tolerance by manipulating stress-induced senescence without compromising natural senescence.

INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is the most economically important oilseed crop produced worldwide and the largest source of vegetable oil and protein for human and animal consumption. Most of the soybean production is carried out in the American continent (USDA, 2022), where is cultivated during summer, mostly under rainfed agricultural practices (Cattivelli et al., 2008). In these conditions, the occurrence of seasonal droughts unavoidably affects soybean productivity which can be reduced by up to 40 % (Le et al., 2012; Cattivelli et al., 2008). Soybean is considered the most drought-sensitive plant among legume species (Clement et al., 2008). Recent studies have shown that global agricultural productivity has exhibited substantial variations during the past decades, and that these variations can be explained by changes in the drought index (Leng and Hall, 2019). In these studies, soybean was the crop that showed the highest correlation between yield reduction and drought conditions, which highlights the importance of increasing drought tolerance in soybean breeding programs.

One of the first symptoms of drought stress in soybean is canopy wilting, which is caused by the loss of cell turgor pressure as a result of cellular dehydration (Carter et al., 1999; King et al., 2009). Several soybean plant introductions (PIs) have been reported during the last decades to exhibit slow canopy wilting phenotype under water deficit conditions (Carter et al., 1999, Kunert and Vorster, 2020). Since then, this trait has been extensively used as a visual marker to select and develop drought-tolerant, high-yielding soybean genotypes in the field (Charlson et al., 2009; Kunert and Vorster, 2020, Sloane et al., 1990).

Slow wilting has been shown to be associated with different water-conservation mechanisms, including improved water use efficiency (WUE), enhanced maintenance of cell turgor and better root exploratory capacity, among other

traits (Kunert and Vorster, 2020). Despite the fact that the precise molecular mechanisms underlying slow wilting phenotype are not fully understood, it is agreed that this trait is a multigenic, moderately inheritable characteristic, which benefits crop performance under drought conditions without affecting yield (Prince et al., 2015; Ries et al., 2012).

Crop performance is defined by the plant's entire life cycle and is affected by the amount of light intercepted by the leaves and biomass accumulation through photosynthesis. Drought affects both biomass accumulation and plant growth, striking photosynthesis and transpiration (Tardieu et al., 2018). Drought can also trigger premature senescence, which further compromises biomass accumulation in cultivated species (Reguera et al., 2013).

Senescence is the last stage of plant development and usually culminates with death at the cellular, tissue, organ, or whole plant level. It is a complex process that involves various molecular and physiological events controlled at the genetic level and modified by environmental conditions (Balazadeh et al., 2008). During this process, plants recycle nutrients from their source organs to their reproductive organs (Gepstein and Glick, 2013). Thus, in grain crops, senescence highly affects plant productivity as it is linked to the production of mature seeds.

During leaf senescence, chloroplasts, which contain 75 % of the nitrogen (N) in the leaf (50 % of which is supplied by RubisCO; Díaz et al., 2005), are the first organelles to be degraded. Meanwhile the nucleus and mitochondria remain active until the culmination of cell death to allow the expression of genes and the production of metabolic energy that enable the progression of senescence (Buchanan et al., 2005). Chloroplast degradation involves the well-orchestrated degradation and remobilization of chlorophyll, protein and lipids. The thylakoid membranes are a very abundant source of carbon (C) that is remobilized. N appears mainly in the form of proteins, so proteolysis steps are essential for remobilization. N recycling is especially important during the reproductive stage (James et al., 2019).

Several stress conditions, including drought, can trigger senescence prematurely. Stress-induced senescence is the main cause of losses in biomass and in grain filling, due to the loss of photosynthetic capacity (Pourtau et al., 2004; Aoyama et al., 2014). In addition to its negative effect on crop yield and quality, premature senescence is also responsible for the short post-harvest life of many vegetables, fruits and flowers (Reguera et al., 2013).

Delaying senescence has been used as a strategy to improve tolerance to environmental stress (Rivero et al., 2007; Reguera et al., 2013; Sade et al., 2018). It has been shown that leaf senescence can be delayed in transgenic

tobacco plants expressing isopentenyltransferase (IPT), a key enzyme for cytokinin (CK) biosynthesis, under the control of senescence-inducible promoters. Under water deprivation conditions, the plants mounted a powerful acclimation response, with stimulation of the photosynthetic rate, greater WUE and minimal yield losses (Rivero et al., 2007). The stimulation of CK production also improves ROS scavenging and promotes the maintenance of photosynthetic capacity (Rivero et al., 2010; Ha et al., 2012) by increasing chloroplast stability under stress conditions (Rivero et al., 2009).

Autophagy is the most studied mechanism involved in the degradation of cellular components. Two types of autophagy have been characterized: micro- and macro- autophagy. In microautophagy, small cytosolic vesicles are engulfed by invaginations of the tonoplast, forming small intravacuolar vesicles that are later degraded by vacuolar hydrolases (Klionsky and Ohsumi, 1999). In macroautophagy (from now on, autophagy), cytosolic components are engulfed by a specialized double-membrane structure, the autophagosome, which carries the recyclable components into the vacuole (Xie et al., 2015). Autophagosomes may also undergo membrane expansion and sequester chloroplasts and/or other organelles for their specific degradation (Masclaux-Daubresse et al 2017). In plants, several components of the autophagic machinery have been identified, including components involved in phagophore seeding (Doelling et al., 2002; Hanaoka et al., 2002; Thompson et al., 2005; Phillips et al., 2008; Li et al., 2015), loading, expansion, closure (Wang et al., 2017, Svenning et al., 2011; Vanhee et al., 2011; Zientara-Rytter et al., 2011; Liu et al., 2012; Michaeli et al., 2014; Rogov et al., 2014; Marshall et al., 2015), and autophagosome fusion to the tonoplast membrane (Li and Vierstra, 2012; Kilonsky and Schuman, 2014; Rogov et al., 2014). RubisCO containing bodies (RCBs) are autophagic vesicles that transport chloroplast stroma proteins to the vacuole (Chiba et al., 2003; Izumi and Ishida, 2011).

A second mechanism operating in chloroplastic protein degradation is mediated by senescence-associated vacuoles (SAVs). While autophagosomes are found in leaves and roots, SAVs only appear in cells that contain chloroplasts (Otegui et al., 2005). Like RCBs, SAVs contain chloroplast proteins such as RubisCO and GS2 (Martínez et al., 2008). In addition, some thylakoid proteins, such as PsaA and Lhcas, have been detected in SAVs. However, no PSII proteins, such as D1 or PSII antenna proteins (LHCII), were found in SAVs (Martínez et al., 2008; Gomez et al., 2019). SAVs are not just transport vesicles as they display high proteolytic activity which turns them into lytic compartments themselves. The cysteine protease SAG12 (senescence-associated gene 12) is among the proteases that accumulate in these compartments (Otegui et al., 2005; Buet et al., 2019). Recently, it was shown that SAVs also participate in chlorophyll degradation during senescence (Gomez et al., 2019).

Two other types of chloroplastic protein trafficking vesicles have been characterized: namely, ATI-PS (ATG8-interacting protein 1-plastic associated bodies) and CCV (Chloroplast Vesiculation-Containing Vesicles). The ATI1 protein participates in vesicular traffic from the endoplasmic reticulum (ER) (Honig et al., 2012) towards the central vacuole. In addition, ATI1 can be detected within plastids and also in the cytosol, associated with vesicles that contain chloroplast-targeted GFP (Michaeli et al., 2014). ATI1 interacts with various chloroplastic proteins, many of which are located in thylakoids and are involved in photosynthesis, such as LHCA4, PsbS, PrxA, FNR1 and APE1 (Michaeli et al., 2014; Zhuang and Jiang, 2019, Buet et al., 2019). The generation of ATI-PS does not require a functional autophagic machinery, but functional autophagy is required for internalization in the central vacuole (Michaeli et al., 2014).

CCV is the most recently described chloroplast degradation pathway and involves a chloroplast-targeted protein named CV, which participates in both natural and stress-induced senescence (Wang and Blumwald, 2014). CV interacts mainly with thylakoid proteins causing the formation of CV-containing vesicles which carry chloroplast proteins into the central vacuole where they are degraded (Wang and Blumwald, 2014). The CV-mediated degradation pathway is independent of autophagy and SAVs (Wang and Blumwald, 2014). Constitutive CV overexpression is lethal. Nonetheless, inducible CV overexpression promotes the formation of CCVs and accelerates senescence, affecting the content of photosystem proteins (PsaB, PsaA and PsbO), and stroma (GS2). Furthermore, silencing of CV genes promotes chloroplast stability and delays stress-induced senescence (Wang and Blumwald, 2014; Sade et al., 2018).

We have previously analyzed the physiological and molecular responses of two soybean genotypes showing contrasting phenotypes under water deficit conditions; the drought sensitive TJS2049 cultivar, and the slow wilting N7001 cultivar, exhibiting stable productivity under a variety of environmental conditions (Gallino et al., 2018). Under dehydration conditions, N7001 exhibited higher WUE, carbon isotope ratio and accumulated dry matter than TJS2049, supporting that the slow wilting genotype was more resistant to drought stress. Using cDNA subtracted libraries enriched in drought-induced genes from N7001 or from TJS2049, we identified a number of differentially expressed stress-related genes that included the autophagy marker *ATG8*, the senescence associated protease *SAG12* and CV encoding genes.

Given the significant evidence supporting that slow-wilting phenotype involves mechanisms that prevent yield reduction under stress (Sloane et al., 1990; Kunert and Vorster, 2020), and that stress-induced premature senescence has a major impact on crop yield, in this work we analyzed the contribution of

different vesicular pathways for protein degradation, in the response to water deficit of slow wilting N7001 genotype, and compared the responses to those exhibited by TJS2049.

We showed that the soybean CCV pathway is activated by water deficit, primarily in the drought sensitive genotype. Moreover, we showed that soybean *CV1* and *CV2* gene paralogs differentially contribute to abiotic stress responses and developmental cues through differences in their regulatory regions and gene expression. While previously characterized *CV* genes are involved in both stress-induced and natural senescence, in soybean, these functions seem to be partitioned in two separate genes with only partially overlapping expression profiles. These results provide an interesting target for gene editing, to increase tolerance to abiotic stress without affecting development and thus promoting a more efficient N use under normal growth and drought conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

The soybean genotypes used were N7001 (Carter et al., 2003) and TJS2049 (Pardo et al., 2014). Soybean plants were grown in a growth chamber in sand/vermiculite (1/1 ratio), with a 16/8 h (light/darkness) photoperiod, with a photon flux of $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ using metallic halogen lamps (400 W) and sodium incandescent lamps (75 W) and temperatures of 30 and 20 °C for day and night, respectively. Plants were watered daily to field capacity, with Rigaud and Puppo (1975) medium supplemented with 10 mM of KNO_3 . In order to attain maximum water retention capacity of the substrate, pots were watered up until excess water drained from the bottom of the pots through the metal mesh. The pots were kept in this condition for 24 h, until no water excess drainage was observed. Maximum volume of water held by the substrate was quantified and the resulting value was used as reference to express the percentage of water retained by the soil substrate during drought stress.

Arabidopsis thaliana accession Columbia 0 (alias Col-0) was used in this study. Seeds were surface sterilized with a solution containing 7 % of bleach and 0.05 % Tween-20, and incubated at 4 °C for 3 days for stratification before placing them in Petri dishes. Plants were grown in vitro in half strength MS medium (2.4 g/L Murashige and Skoog, 0.5 g/L 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid hydrate and 0.5% phyto agar, pH 5.7), at 22 °C with a 16/8 h day/night cycle and a photon flux of $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Arabidopsis plants were also grown in pots filled with a mixture of moss peat and vermiculite (1:1). Seeds were germinated in sterile conditions on MS plates,

transferred to pots (covered with a plastic dome during 2 days), and allowed to grow at 22 °C, under a 16/8 h (light/darkness) regime, using half strength MS for irrigation.

Soybean experimental conditions

Soybean plants were grown at maximum substrate water retention capacity until they reached the V2 (vegetative 2) developmental stage (plants with two sets of unfolded trifoliolate leaves).

Dehydration conditions were imposed by withholding irrigation, until substrate water capacity reached 50 % of maximum retention capacity (water potential Ψ = ~-2.2 MPa). Non-stressed control plants, at V2 stage, continued to be daily irrigated at maximum substrate water capacity (100 %). Treatment with 1 Mm methyl viologen was performed for 24 h by including this compound in the irrigation solution.

Experimental replicas of five pots per genotype and per treatment were used. Replicas were randomly distributed in the growth chamber to rule out possible variations due to small differences in environmental conditions within the growth chamber.

Northern Blot

Total RNA was isolated from drought stressed, hormone and methyl viologen treated plants, and from non-stressed control plants (Ctrl) of soybean N7001 and TJS2049 cultivars, using standard procedures. Ten μ g of total RNA were separated in denaturing formaldehyde agarose gels and transferred onto nylon membranes (Hybond XL, Amersham Pharmacia Biotech). Ethidium bromide staining of the gels was used to ensure that equal amounts of RNA were loaded in the gels. Membranes were prehybridized at 65 °C in 5X SSPE, 5X Denhardt's solution, 0.2 % SDS and 0.5 mg/mL denatured salmon sperm DNA, and hybridized overnight at 65 °C with [α -³²P] dCTP labeled probes. Fifty ng of DNA from purified cDNA insert clones were labeled using Amersham Rediprime II DNA Labeling System (GE Healthcare Life Sciences) and used as hybridization probes.

The sequence spanning the positions nt. 111 to nt. 593 of CV1 gene was used as a probe for CV1 and CV2 genes (93 % identity within this sequence region). Probes were labeled using the MegaPrime DNA Labeling System kit (GE Healthcare, Amersham) and purified by G-25 columns from GE Healthcare, Amersham. Radioactive membranes were exposed overnight and revealed in a Phosphorimager.

qRT-PCR

For cDNA synthesis, 2 µg of total RNA were reverse transcribed with QuantiNova Reverse Transcription (RT) Kit (Qiagen, Germany). To estimate amounts of cDNA templates of the selected genes, quantitative RT-PCR assays were performed using specific primers listed on Table S1, designed by Primer3Plus (Untergasser et al., 2012). q-PCR was performed in an Applied Biosystems StepOne real time PCR system. Each 10 µL reaction contained 5 µL of SYBR Green PCR Master mix (2 X), 0.5 µM primers mix and 2 µL of template cDNA (1/10 dilution). The thermocycler was programmed to run for 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 60 °C. Transcript accumulation of each gene was normalized relative to the constitutively expressed Elongation Factor 1 B (Glyma.02G276600). Amplification efficiencies of the different primer combinations were all > 90 %. Relative expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Each data point is the mean value of three biological replicates. Two technical replicates were used for each sample.

Phylogenetic Analysis

Deduced amino acid sequences from CV genes were retrieved from the Phytozome database. Sequences were aligned with ClustalW and phylogenetic analysis was done using MEGA 6 software (Tamura et al., 2013). Phylogenetic tree was done using the Neighbor joining method. The search on the gymnosperms, carnivorous plants and genomes outside plant kingdom was performed using protein BLAST and tBLASTn at NCBI database.

Constructs for promoter activity analysis

Constructs for expression analysis of *GmCV1* and *GmCV2* were generated by cloning the 1500 bp promoter sequences upstream of the start codon of each gene into pBGWFS7 vector (Karimi et al., 2002), to regulate GUS expression. Promoter sequences were PCR amplified from genomic DNA of soybean TJS2049, using Kapa HiFi Hotstart DNA polymerase. Fragments of approximately 3000 bp were amplified using primers Fw 5'-CATAGATACTCATCGAAAATGG-3' and Rv 5'-GTTGAGGATGTTTTGGGGGAA-3' for Pro-*GmCV1*, and Fw 5'-GCCAAGTCCCAAAGTGAACA-3' and Rv 5'-GTGGCTTTGCGGGGTTGAAAGAAGCGT-3' for Pro-*GmCV2*. *Bam*HI and *Xho*I restriction sites were added to 1500 bp fragment through nested PCR using primers Fw 5'-AATGGATCCTTATAGATGATAAACAG-3' and Rv 5'-TGGTCTCGAGGGTGAGAGTTGAGTTGAG-3' for Pro-*GmCV1* or Fw 5'-AATGGATCCTTATTTTGGTCAGGGATT-3' and Rv 5'-TGGTCTCGAGGGTGAGAGTTGAGACAAT-3' for Pro-*GmCV2*. PCR fragments were cloned into *Bam*HI and *Xho*I restriction sites in pENTR-2B (Invitrogen-Thermo Scientific) into, and the resulting clones were sequenced and further

recombined into pBGWFS7, using Gateway LR Clonase II (Invitrogen-Thermo Scientific). The constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens*, strain C58C1 (Deblaere et al., 1985) by electroporation and used for Arabidopsis transformation.

Constructs for overexpression.

For the generation of constructs for conditional overexpression of GmCV1 and GmCV2, cDNA was synthesized from total RNA samples of soybean TJS2049 exposed to dehydration stress. Two µg of total RNA was treated with DNaseI and reverse transcribed into cDNA using oligo(dT) primer and RevertAid reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Coding sequences (CDS) were PCR amplified using Kapa HiFi Hotstart DNA polymerase and the primers Fw 5'-ATAAATTTTCTCAACTCAACT-3' and Rv 5'-CATAAATCCAATCCAGTACTAG-3' for GmCV1 or Fw 5'-TCCAACCTATAACTCTAACCA and Rv 5'-AAAAAAAAACGTGACATATCA-3' for GmCV2. BamHI and XhoI restriction sites were added through nested PCR using primers Fw 5'-TCAACGGATCCC ATGAGGACCAGTTGCTTCC-3' and Rv 5'-TTAGCTCGAGTCACATGGAGAAGCAACT-3' for GmCV1 or Fw 5'-ACTGGATCCATGAGGACCACTTGCTTA-3' and Rv 5'-TGCGCTCGAGTCACATGGAGAAGCAGCTG-3' for GmCV2. CDSs for both genes were cloned into BamHI and XhoI restriction sites of pENTR-2B vector. The resulting clones were fully sequenced and further recombined into pHb7m34GW vector in combination with β-estradiol inducible promoter (p1R4-pG1090:XVE) and FLAG epitope (pEN-R2-3xFLAG-L3), using Gateway LR Clonase Plus (Invitrogen-Thermo Scientific). The constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens*, strain C58C1 (Deblaere et al., 1985) by electroporation and used for Arabidopsis transformation.

Arabidopsis transformation and molecular characterization of transgenic lines

Transgenic Arabidopsis plants were produced by *Agrobacterium* mediated floral-dip transformation (Clough and Bent, 1998). Transgenic lines were identified by PCR amplification using specific primers for GmCV1 or GmCV2 promoters or CDS-FLAG fusions. For promoter analysis, primers Fw 5'-AATGGATCCTTATAGATGATAAAACAG-3' and Rv 5'-TGGTCTCGAGGGTGAGAGTTGAGTTGAG-3' for ProGmCV1 or Fw 5'-AATGGATCCTTATTTTGGTCAGGGATT-3' and Rv 5'-TGGTCTCGAGGGTGAGAGTTGAGACAAT-3' for ProGmCV2 were employed. For CDS-FLAG fusions, primers Fw 5'-GGTGGCGCCAAATGGAGCG-3' and Rv35STer 5'-AAGTGCGAGCGTAAAGGATAG-3' for GmCV1-FLAG or Fw 5'-TGGTGGCGCCAAATGGAGCC-3' and Rv35STer for GmCV2-FLAG were used. For GmCV1 or GmCV2-FLAG overexpression lines (OE), expression of

the transgenes was confirmed in three independent T2 lines by semiquantitative RT-PCR after treatment of plants with 5 μ M β -estradiol (Sigma-Aldrich, E2758) using primers Fw 5'-GGTGGCGCCAAATGGAGCG-3' and Rv35STer 5'-AAGTGCAGCGTAAAGGATAG-3' for GmCV1-FLAG or Fw 5'-TGGTGGCGCCAAATGGAGCC-3' and Rv35STer for GmCV2-FLAG. Expression of Arabidopsis actin 2 gene (AT3G18780) was used as an internal control, by RT-PCR amplification with primers F: 5'-GCAACTGGGATGATATGGAAAAGA-3', and R: 5'-TTTGTGGGAATGGAAGCTGCT-3'.

***Arabidopsis thaliana* experimental conditions**

For promoter expression analysis, Arabidopsis transgenic seedlings were grown *in vitro* for 5 to 7 days and exposed to abiotic stress for 3 days. Seedlings were transferred to Petri dishes containing MS supplemented with 150 mM NaCl (salt stress) or 2 μ M methyl viologen (oxidative stress), 40 % polyethylene glycol (PEG) 8000-infused agar plates (osmotic stress) and liquid MS with no air pumping (waterlogging stress). For hormone treatments, seedlings were transferred to MS supplemented with 50 μ M ABA (abscisic acid), 100 μ M ACC (aminocyclopropane-1-carboxylic acid), 10 μ M gibberellin (GA3), 0 to 2 mM salicylic acid (SA) or 0 to 1 μ M indole acetic acid (IAA). For methyl jasmonate (Me-JA) treatment, a cotton swab embedded in a 30 μ M Me-JA solution was introduced into the plate which was tightly sealed with plastic wrap during treatment. An equal dilution of ethanol was used as control. Treatments with cytokinin were performed as follows: Seven-day-old *in vitro* grown seedlings were transferred to peat moss and grown for 10 more days under 16/8 light/dark photoperiod. Plants were subsequently transferred to dark for 5 days and were both watered and sprayed with 5 μ M BAP or only water during this period. Control plants were kept in the same light conditions and treated with 5 μ M BAP or water. GUS activity was monitored by histochemical analysis as described by (Vitha et al., 1995). Experiments were repeated five times. Three independent lines for each promoter construct were analyzed in every experiment.

Immunoblot assays

One hundred and twenty mg of tissue were frozen in liquid N₂ and grounded using a bead beater homogenizer. Proteins were extracted in an extraction buffer (100 mM Tris-Cl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 % SDS, 1 % protease inhibitor cocktail Sigma Cat. no. P9599) in a 4:1 w/v ratio. Samples were centrifuged at 16000x g for 10 min at 4 °C. Supernatants were transferred to fresh eppendorf tubes and stored at -80 °C. Thirty μ g of total proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to a Hybond-N+ nylon membrane (GERPN203B), and probed as described by Wang et al., (2011). Antibodies raised against PsbO (AS05092), PsaB (AS06166A), PsbA/D1 (AS05084),

GS1/GS2 and Lhcb2 (AS01003) were from Agrisera (Vännäs, Sweden). Antibodies raised against FLAG were from Sigma Aldrich (SAB4301138). IRdye 800 goat anti-rabbit secondary antibodies were obtained from LI-COR (926-32211). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibodies were purchased from Abcam (ab789).

Statistical analysis

Statistically significant differences were determined based on the Student's t-tests.

RESULTS

CV genes are differentially regulated in drought sensitive and drought tolerant soybean genotypes.

We have previously generated a subtracted cDNA library enriched in drought-induced genes from N7001 or TJS2049 genotypes (Gallino et al., 2018). Among the differentially regulated genes identified in this study, we found a CV encoding gene (Glyma.06G072000), designated as *CV1*.

In order to assess the contribution of the CV-mediated vesicular pathway to soybean responses to water deficit, we used northern blot to determine the expression profile of *CV1* in leaves and roots from drought sensitive (TJS2049) and slow wilting tolerant (N7001) genotypes exposed to dehydration or oxidative stress. Drought stress was imposed by withholding irrigation until maximum substrate water retention capacity reached 50 % (water potential of $\Psi = \sim 2.2$ MPa), while non-stressed control plants continued to be daily irrigated at 100 % substrate capacity.

In addition, we monitored *CV1* expression profile in response to oxidative stress, as this is a secondary stress condition in plants exposed to water deficit. Methyl viologen (MV) was used to induce oxidative stress by promoting the accumulation of superoxide anion radicals in chloroplasts, and *CV1* transcript accumulation was monitored 24 h after treatments.

The results showed that both drought and oxidative stress conditions induced higher levels of *CV1* transcript accumulation in TJS2049 than in N7001 (Figure 1A), suggesting that the CCV pathway has a more significant contribution to stress responses induced in the sensitive cultivar, compared to the response of the slow wilting genotype. Interestingly, *CV1* was also significantly induced

upon dehydration treatment in roots from both TJS2049 and N7001, indicating a role for this pathway in non photosynthetic tissues.

Most angiosperms sequenced so far contain a single copy of the *CV* gene. In the case of legumes, soybean and trifolium are the only species containing two copies of *CV* genes (Tables S2). Phylogenetic and synteny analysis denote that in most species containing more than one *CV* gene, copies appeared through gene duplication, which seems to be the case for soybean (Figure S1). Interestingly, *CV* genes have not been found in any organism outside the angiosperm plant group, including chlorophytes, bryophytes, and the gymnosperms sequenced till date (Table S2).

Soybean *CV1* (Glyma.06G072000) and *CV2* (Glyma.04G070000) genes encode proteins that have 84/88 % amino acid sequence identity/similarity with each other. However, these genes share 93 % nucleotide sequence identity within the DNA fragment that was used as hybridization probe for northern blots. Therefore, it is likely that the hybridization signals observed in the northern analysis evidenced the combined accumulation of both *CV1* and *CV2* transcripts.

In order to determine whether soybean *CV* gene paralogs have undergone functional specialization, or on the contrary, they have maintained redundant functions, the specific expression pattern of *CV1* and *CV2* was analyzed by RT-qPCR in leaves and roots of TJS2049 or N7001 after exposure to dehydration conditions or under optimal conditions (Figure 1B). Induction levels were expressed as fold change by comparing drought-stressed versus well-watered controls. Consistent with the northern blot analysis, both genes were upregulated in TJS2049 and N7001 in response to water deficit, but the induction levels were higher in TJS2049 than in N7001. The higher stress-induced levels for both genes were observed in roots, where *CV1* transcript accumulation reached 40.6 ± 4.0 fold in TJS2049 and 29.7 ± 0.9 in N7001, and *CV2* transcript accumulated in 206.6 ± 8.1 in TJS2049 and 64.0 ± 20.9 in N7001. Stress-induction of *CV1* in leaves was considerably higher in TJS2049 than in N7001, whereas no significant differences were observed for *CV2*. Despite the fact that *CV2* showed higher fold change levels than *CV1*, the most actively expressing gene was found to be *CV1*, which had at least 10 times higher basal expression levels in non stressed control plants (Figure 1C). Taken together, these results suggest that *CV1* has a larger contribution to stress-induced CCV pathway than *CV2* at the whole plant level, and that this route is predominantly induced in the sensitive genotype.

The biological function of *CV* has been characterized in detail in *Arabidopsis* (Wang and Blumwald, 2014), where it has been demonstrated that the protein accumulates in leaf chloroplasts under a number of abiotic stress conditions.

The deduced amino acid sequence of CV1 and CV2 share 39/53 % and 35/53 % sequence identity/similarity with Arabidopsis CV, respectively. Like in Arabidopsis, soybean CV encoded proteins are predicted to contain a chloroplast transit peptide at the N-terminus, a transmembrane domain and a C-terminal conserved domain (Figure 1D). The graphical representation of the similarity patterns within CV encoded proteins from soybean, Arabidopsis and rice strongly suggests functional homology between these proteins (Figure 1E).

Differential regulation of vesicular pathway marker genes involved in leaf senescence

In order to gain insight into the contribution of other vesicular routes involved in stress-induced senescence in soybean, we analyzed the expression profile of different marker genes for autophagy, SAVs and ATI-PS vesicular pathways in N7001 and TJS2049, under optimal conditions or exposed to dehydration stress. Because of the well-established role of CKs on counteracting natural or stress-induced leaf senescence (Sade et al., 2018), we also compared the expression profile of a CK response marker gene (*RR9*) in soybean contrasting genotypes in response to water deficit.

For the selection of marker genes, we took advantage of the previously generated cDNA subtracted libraries (Gallino et al., 2018) and from the reported RNA-seq and microarray data of soybean genes differentially regulated under dehydration conditions (Table S3). In silico analysis of the expression profile of genes encoding representative members of autophagy, SAVs and ATI-PS pathways were carried out using available expression data at Genevestigator (Hruz et al 2008). The following genes were upregulated upon dehydration stress: autophagy *ATG8b* [Glyma.07g261000], *ATG8f* [Glyma.05g058300], *ATG8g* [Glyma.17g140700], *ATG8h* [Glyma.10g009300], *ATG8i* [Glyma.02g008800], and *ATG8j* [Glyma.11g031800]; SAVs *SAG12* orthologs (Glyma.14G085800 and Glyma.17G239000); and *ATI1* (Glyma.18G234100 and Glyma.09G258600) (Figure S2). The dehydration-induced expression profile of these genes, both in leaves and roots, was also reported in other available RNA-seq studies (Shin et al., 2015) and microarray data (Le et al., 2012; Ha et al., 2015) (Table S3).

Based on these analysis, and on the presence of several vesicular pathway genes in the previously constructed cDNA libraries (Table S3), the genes encoding *ATG8* (Glyma.11G031800) and *SAG12* (Glyma.17G239000) orthologs, were selected as markers for monitoring the activation of autophagy and SAV vesicular pathways, respectively. In addition, two stress-induced *ATI1* genes (Glyma.18G234100 and Glyma.09G258600), and the response regulator

RR9 gene (Glyma.11G155100), were selected as markers for ATI-PS pathway and for CK primary response, respectively.

Expression of marker genes was used as a readout for the detection of different senescence-associated vesicular pathways in plants exhibiting contrasting phenotypes after exposure to dehydration conditions. RNA samples were extracted from N7001 and TJS2049 genotypes grown until the V2 stage and exposed to dehydration until reaching 50 % of the substrate water retention capacity, or in plants that were kept irrigated (controls). Transcript accumulation levels were assessed by RT-qPCR and fold changes were calculated.

The CK response gene *RR9* was downregulated in leaves of TJS2049 exposed to water deficit, whereas this gene was upregulated in the N7001 genotype. On the other hand, *RR9* was induced in roots with no significant differences between genotypes (Figure 2). This result is consistent with the delayed stress-induced leaf senescence phenotype exhibited by N7001 (Gallino et al., 2018).

All of the vesicular pathway marker genes were upregulated in response to water deficit regardless of the genotype, both in leaves and roots. However, these genes exhibited differential induction levels between slow-wilting and drought-sensitive soybeans. Similar to *CV* genes, *SAG12* exhibited higher induction levels by drought stress in TJS2049 than in N7001 plants, while *ATG8* and *ATI1* showed the opposite expression pattern. *ATG8* only showed a strong induction in leaf tissues, with a fold change of 2.0 ± 0.6 for TJS2049 and 10.9 ± 0.1 for N7001. Induction of *SAG12* was stronger in TJS2049 than in N7001, reaching a fold change of 23.2 ± 7.4 for TJS2049 and 12.3 ± 1.3 for N7001. Similar responses were evidenced in roots for *SAG12*, reaching a fold change of almost 8 in TJS2049 while only a 2 fold induction in N7001. *ATI1* reached the maximum level of induction in the leaves of N7001 showing a 4.5 fold increase, while no significant induction of this gene was observed in TJS2049 leaves (Figure 2).

Overall, marker genes for vesicular pathways with remobilization functions (autophagy and ATI-mediated) reached higher induction levels under stress conditions in the drought tolerant N7001 genotype than in TJS2049, which is in agreement with a pro-survival role of these pathways. In contrast, *SAG12* and *CV* genes reached higher induction levels in the drought-sensitive cultivar (Figure 1B and Figure 2). Taken together, these results seem to indicate that stress-induced senescence is more installed in the TJS2049 genotype than in N7001. Noteworthy, the induction levels of *ATG8*, *SAG12* and *ATI1* were overall lower than those exhibited by *CV1* gene in both plant genotypes (Figure 1B), suggesting a major role for *CV1* in stress-induced senescence in soybean.

Differential expression patterns of CV1 and CV2 gene paralogs under abiotic stress and natural senescence

To further investigate the functional relationship of CV1 and CV2 in soybean, we studied their expression pattern by comparing their tissue-specific promoter activity under different conditions. Despite the high sequence identity shared by CV1 and CV2 at their coding regions, less conservation was observed at their promoter regions, considering the first 1500 bp upstream of the translation initiation codon. It was assumed that this region included the promoter elements that are necessary for CV gene regulation. *In silico* analysis of the promoter sequences of CV1 and CV2 (proCV1 or proCV2, respectively), revealed 3 highly conserved regions, and 2 regions with low conservation (Figure 3A). Important differences at the cis-acting element composition were observed (Figure 3B). GATA transcription factor and SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN (SBP) elements appeared in proCV1 but were absent in proCV2. On the other hand, a number of CG-1 elements, absent in proCV1, were present in proCV2. Important differences were also observed in auxin response elements, being more abundant in proCV1 than in proCV2. In contrast, b-HLH elements were more abundant in proCV2 than in proCV1. In addition, proCV2 displayed a higher number of elements characteristic of seed storage proteins (RY repeat, SEF1 and SEF4).

To gain insight on the differential regulation of CV1 and CV2, the 1.5 kb promoter regions of CV1 or CV2, were PCR-amplified from TJS2049 genomic DNA, cloned upstream of a promoterless GUS reporter gene and used for Arabidopsis transformation. The ability of soybean proCV1 and proCV2 to control GUS expression under optimal growth conditions or in response to different stresses was examined in stable Arabidopsis transgenic plants. We used Arabidopsis because of the advantages of this plant species (small size, short life cycle) compared to soybean, for monitoring tissue-specific CV expression patterns simultaneously in all tissues, as well as during the entire plant life cycle.

To monitor the promoter activities of CV1 and CV2 under abiotic stress conditions, we studied specific GUS activity of *in vitro* grown Arabidopsis transgenic seedlings exposed to salt stress (150 mM NaCl), osmotic stress (40 % PEG) or hypoxia (submersion in liquid MS without air pumping). Histochemical staining of whole plants was performed after 3 days of abiotic stress-treatments or in non-treated control plants. At least 3 independent transgenic lines transformed with same construct were analyzed for GUS activity in parallel experiments (Figure 3C-D).

Consistent with the RT-qPCR analysis of CV1 and CV2 expression profiles in soybean, these two genes exhibited significant differences in promoter activity

under stress conditions, when analyzed in the *Arabidopsis* heterologous system. ProCV1-driven GUS activity was triggered in shoots and roots of plants exposed to all abiotic stress conditions (Figure 3C). ProCV1 induced GUS expression in whole leaves, and at the root level, expression was specially induced at the root tip, including the columella cells and the lateral root cap, as well as at the maturation zone of the principal root and at lateral roots. On the contrary, GUS expression resulting from ProCV2 activity was only evident after hypoxia stress, a condition that typically triggers generalized senescence in plants. Under these conditions, ProCV2-GUS activity was observed in roots and in the vascular aereas of shoots, but in all cases, GUS staining signal was markedly weaker in these plants than in ProCV1-GUS transgenic plants (Figure 3D). These results support the idea that stress-induced accumulation of CV relies primarily on *CV1* gene expression.

In view of the current knowledge of CV genes from *Arabidopsis* and rice, demonstrating a role for these genes in natural senescence, we explored the functional specificity of *CV1* and *CV2* from soybean during different developmental stages and cues.

In young seedlings of 10-days old transgenic plants, under optimal conditions, GUS expression controlled by proCV1 or proCV2 was low or absent, except for the tip of the shoot in the mid vein, where vascular tissue (xylem) differentiates (Figure 4A). In leaves of young juvenile transgenic plants (22-days old), GUS staining was observed only in serrations, regardless of the promoter used for driving GUS expression. In addition, GUS staining was detected at the vascular tissues of the developing seedling in shoots and roots, especially in the root's central zone, and in the root tip and lateral root primordia (Figure 4A).

To shed light on the specific contribution of *CV1* and *CV2* paralog genes to the control of natural senescence, we examined their detailed expression pattern in transgenic *Arabidopsis* plants throughout developmental progression. GUS activity resulting from *CV1* or *CV2* promoter activation was observed in senescent leaves, but not in young green leaves of transgenic plants (Figure 4B). GUS staining of mature leaves started at the leaf margins, consistent with the progression of natural senescence. However, proCV2 was activated at earlier developmental stages, and to higher levels than proCV1.

These clear differences in promoter activities in leaf tissues support a functional specialization of these genes during leaf senescence. However, both *CV1* and *CV2* promoters exhibited similar activities in flowers and siliques, especially in sepals, anthers and the stigma, once petals and sepals were abscised, and at the silique abscission zone (Figure 4C). Taken together, these results suggest that both genes play a role in tissues undergoing developmental processes

involving cell death, but *CV2* has a larger contribution to the natural leaf senescence process than *CV1*.

CK inhibits *CV2* expression under dark-induced senescence.

In *Arabidopsis*, CK delays senescence and suppresses *CV* gene expression (Wang et al., 2014). Our results are consistent with the idea that soybean *CV1* and *CV2* gene paralogs have undergone a functional specialization process manifested through divergence in gene expression. While *CV1* is upregulated by abiotic stress, *CV2* appears to have a more predominant role in developmental-induced senescence. Together, these data motivated us to investigate CK-regulation of *CV1* and *CV2* gene expression, by monitoring the promoter activity of these genes under dark-induced senescence of *Arabidopsis* transgenic lines, and assessing the effect of CK treatment on *CV* inhibition of gene expression.

Arabidopsis transgenic Pro*CV1*-GUS and Pro*CV2*-GUS lines were grown during 17 days under regular light conditions and thereafter transferred to darkness for 5 days, with or without exogenous CK (5 μ M BAP). GUS staining assays showed that, in the absence of BAP, both *CV1* and *CV2* promoters were strongly activated during dark-induced senescence. However, clear differences in the gene regulation were observed in the presence of exogenous BAP, where the activity of the *CV2* promoter was almost completely inhibited in the presence of BAP, while no inhibition was observed for *CV1* (Figure 5A). CK differential inhibition of *CV* genes was confirmed by quantitative analysis of GUS activity by performing fluorimetric assays in two independent representative transgenic lines for each construct (Figure 5B). Similar to *Arabidopsis CV* gene, soybean *CV2* appears to be strongly downregulated by CK under senescence-inducing conditions, whereas *CV1* promoter activity was unaffected by this hormone.

Hormonal control of *CV* promoter activity

The activity of *CV1* and *CV2* promoters suggests that soybean *CV* paralogs have different contributions to development and stress-related biological processes.

Plant hormones regulate central features of development and stress adaptation. In fact, most known plant growth regulators, such as auxin, ABA, CK, among others, have been shown to mediate different developmental and stress responses through complex crosstalk signaling pathways (Waadt et al., 2022).

To further investigate the regulation of *CV1* and *CV2* gene expression, we studied their specific promoter activity in response to the treatment of plants with different stress-related hormones. Arabidopsis transgenic plants expressing GUS reporter gene under the control of *CV1* or *CV2* promoters, were treated with 50 μ M ABA, 100 μ M ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), 30 μ M methyl jasmonate (Me-JA), 10 μ M gibberellic acid (GA3), 0.5 mM or 1 mM salicylic acid (SA) and 0.1 μ M or 0.5 μ M 3-indoleacetic acid (IAA). Histochemical GUS activity was monitored 4 h or 24 h after hormone treatments (Figure 6, Figure S4, respectively).

All treatments induced GUS activity driven by pro*CV1*, but the highest induction levels were observed in response to exogenous ABA or auxin (IAA), both in shoot and roots. In contrast, significant pro*CV2* activity was only induced in response to auxin treatments, where GUS activity was detected in the vascular tissues of roots but not in shoots. Auxin regulation of both *CV1* and *CV2* was consistent with the presence of several auxin response elements in their promoter regions (Figure 3B), and with the observed basal expression patterns of these genes (Figure 4A and Figure S5), that coincides with auxin production sites (Aloni et al., 2003). On the other hand, only pro*CV1* responded to typical stress hormones, such as ABA and SA, supporting the role of this paralog in stress responses.

CV overexpression led to chloroplast protein degradation

The biological function of CV has been extensively characterized in Arabidopsis and rice, where it was shown to interact with thylakoid and stromal proteins and promote stress-induced chloroplast degradation (Wang et al., 2014, Sade et al., 2018). Except for the highly conserved C-terminus domain of CV proteins, the overall sequence similarity between CVs from different plant species is no higher than 50 %. Despite this, functional conservation between CV proteins has been demonstrated, at least for Arabidopsis and rice genes. Given the features in soybean CV encoded proteins, including the presence of a chloroplast transit peptide, a transmembrane domain and a highly conserved C-terminus domain, it is presumably that soybean CVs have similar biological function as Arabidopsis and rice orthologs. To experimentally verify this assumption, we used a β -estradiol inducible overexpression system to drive the expression of CV2-FLAG fusions in transgenic Arabidopsis and analyzed the effect of CV2-overexpression in specific chloroplast protein levels. Two independent stable transgenic lines, exhibiting high CV2 transcript and protein accumulation after β -estradiol treatment, were selected for further characterization. Wild type and transgenic Arabidopsis plants were grown *in vitro* for 7 days and subsequently treated with 5 μ M β -estradiol for 12 h

(overnight) or for 3 days. Leaf protein samples from untreated controls or β -estradiol treated plants, were analyzed in immunoblot assays to determine the levels of PSI complex subunit PsaB, and PSII subunits D1 and PsbO, as well as the stromal glutamine synthase 2 (GS2) and plastocyanin (PC) (Figure 7). The results showed that overexpression of CV2 resulted in reduced levels of chloroplast proteins, especially PsaB, D1 and PsbO, confirming a functional conservation of soybean CV2.

DISCUSSION

Breeding soybean for the development of drought tolerant high yielding cultivars has posed major challenges. Traits associated with drought tolerance frequently lead to yield penalties under non stress conditions (Hufstetler et al., 2007; Chaudhary et al., 2019). Nevertheless, there is significant evidence supporting that the slow canopy wilting phenotype in soybean is linked to drought tolerance without affecting yield (Sloane et al., 1990, Kunert and Vorster., 2020). This polygenic trait is associated with a number of reported QTLs for the regulation of WUE (Charlson et al., 2009; Abdel-Haleem et al., 2012; Chamarthi et al., 2021), canopy temperature (Bazzer and Purcell, 2020), large root system (Pantalone et al., 1996), and others. However, the precise mechanisms responsible for the slow wilting phenotype remain unclear. In this work we addressed the question of whether the mechanisms involved in the control of stress-induced senescence may contribute to the differences in drought tolerance observed between two contrasting soybean genotypes, one of them exhibiting slow wilting under drought conditions.

We previously established that the slow wilting N7001 soybean genotype has improved WUE, carbon isotope ratio and increased accumulation of dry matter than TJS2049 after exposure to drought conditions (Gallino et al., 2018). In addition, comparative studies of the drought responsive transcriptomes of TJS2047 and N7001 genotypes showed significant differences between these genotypes in the expression of genes involved in different vesicular pathways associated with natural and stress-induced senescence (Gallino et al., 2018). In this work, we provide evidence for the differential contribution of CCV, autophagy, SAV and ATI-PS pathways in the response to water deficit of these two soybean contrasting genotypes, suggesting that the control of stress-induced senescence play an important role in soybean responses to drought stress. In addition, we confirmed the negative correlation of the induction of the CCV pathway with drought tolerance in soybean.

RT-qPCR expression analysis of marker genes involved in autophagy (*ATG8*), SAVs (*SAG12*), CCV (*CVs*) and ATI-PS (*ATI1*) vesicular pathways in response

to dehydration, indicated that all the marker genes were upregulated in leaves and roots of both N7001 and TJS2049 genotypes (Figure 1B and Figure 2A and 2B). However, the induction levels of these genes differed significantly between genes and genotypes. Regardless of the genotype, CV genes exhibited the strongest upregulation in response to dehydration stress, suggesting that the CCV pathway plays a prominent role in soybean responses to drought stress. Noteworthy, the basal expression level of CV1 in non-stressed conditions, was at least 10 times higher than CV2 (Figure 1C), indicating that CV1 played a more relevant role than CV2 under stress conditions.

Genotypic differences of CV and SAGs stress-induction levels were observed in root tissues, where these genes reached higher induction levels in TJS2049 than in N7001. In contrast, ATG8 and AT11 were more induced in N7001 than in TJS2049, and these differences were observed both in leaves and roots. Marker-gene expression profiles were consistent with the enhanced stress-induced senescence symptoms observed in TJS2049 genotype: a higher induction of CV and SAVs pathways and a lower induction of autophagy and ATI-mediated degradation. While CCV and SAVs pathway are associated with recycling mechanisms typical of senescent tissues (Wang and Blumwald, 2014; Sade et al., 2018; Otegui et al., 2005), autophagy and ATI-mediated pathways have been shown to have also a pro-survival role by participating in recycling of damaged cellular components (Chen et al., 2019). Thus, mechanisms involved in the control of the onset of stress-induced senescence may contribute to the slow wilting phenotype exhibited by N7001. Consistently, the higher stress-induction levels of RR9, a CK responsive gene, in leaves of N7001 (Figure 2A) supports a lower level of stress-induced senescence in this genotype.

As CV proteins are the central component of the CCV pathway for chloroplast degradation, we hypothesize that the enhanced expression of these genes promotes susceptibility to drought. Nevertheless, the fact that CV genes were strongly upregulated in root tissues indicates a role for this pathway also in non-photosynthetic tissues. Interestingly, *in silico* analysis of gene expression profiles of soybean gene families encoding ATG8, SAG12, AT11 and CV, showed that, except for one member of the SAG12 gene family, out of at least 43 genes, CVs are the only genes that exhibited strong upregulation by abiotic stress (salinity) in roots. (Figure S2). RT-qPCR analysis of vesicular pathway genes confirmed that marker genes, other than CVs, showed very low induction levels in roots (Figure 2B).

During leaf senescence, chloroplast degradation is an early event, which results in remobilization of nutrients and energy to developing tissues and storage organs, such as seeds (Avila-Ospina et al., 2014). In crops, N remobilization during seed maturation is highly correlated to grain yield and quality (Kichey et

al., 2007). In legumes, roots are an important source of N, but the role of vesicular pathways in N remobilization from roots is poorly understood. As a legume, soybean can establish symbiotic association with N-fixing bacteria of the *Rhizobium* genus, which are housed in the root nodules. Drought inhibits nodulation and N fixation, and soybean yield is especially affected when drought occurs during flowering and during the establishment of pods, at which time the nodules start showing senescence symptoms (Márquez-García et al., 2015). There is a strong correlation between root and nodule parameters and the biomass accumulated in the aerial part in drought tolerant soybean varieties (Fenta et al., 2012, 2014). Although N remobilization from the root to the seeds is poorly documented, a study in *Brassica napus* showed that more than 11 % of the N in the seeds comes from the root (Rossato et al., 2001). These observations indicate that the root is an important source organ for grain filling during plant senescence.

The role of CCV pathway in root senescence has not been previously explored, and little is known about the role of other vesicular pathways in roots. In *Arabidopsis*, SAG12 protease has been shown to participate in root N remobilization to the seeds (James et al., 2019). In rice, autophagy has been shown to mediate root plastid degradation during energy limitation conditions (Izumi et al., 2015). Similarly, this pathway is involved in amyloplast degradation of *Arabidopsis* during water stress (Nakayama et al., 2012), and in root architecture in response to osmotic stress and nutrient starvation (Slavikova et al., 2008). In addition, several ATG8 isoforms (ATG8c, ATG8d, ATG8g, ATG8h) have been related to xylem and phloem differentiation in roots and stems of *Populus trichocarpa* (Wojciechowska et al., 2019). Degradation of organelles also occurs in phloem cells, where the few that remain are located in a peripheral strand of cytoplasm along the cell wall (Knoblauch and van Bel, 1998). However, the mechanisms involved in this degradation process are largely unknown. The biological significance of CCV pathway in roots is unknown, but it is possible to speculate that CVs could play an important role in N remobilization from root plastids during development as well as under stress conditions.

Soybean genome has two CV paralog genes that, based on synteny analysis, arose from a duplication event throughout evolution of this plant species (Figure S1). Soybean has undergone two whole genome duplications during evolution (Roulin et al., 2013). Gene expression divergences, resulting from changes in the regulatory regions, have been proved for a wide number of gene paralogs (Lian et al., 2020). The differential expression levels of *CV1* and *CV2* observed by RT-qPCR in soybean suggested that these genes may have diverged from each other to participate in different biological processes. *In silico* analysis showed that *CV1* and *CV2* deduced proteins share 88 % sequence similarity (Figure 1D), but their promoter regions differ in the presence and number of

several regulatory elements (Figure 3B). For example, GATA and SBP response elements were present in *CV1* and absent in *CV2* promoter regions, whereas CG-1 elements were present in *CV2* and absent in *CV1* promoters. The *CV2* promoter also had a higher abundance of b-HLH and seed elements (RY repeat, SEF1 and SEF4). Transcription factors of the GATA, SBP, CG-1, b-HLH and MADS-box families are involved in the transcriptional regulation of a wide variety of developmental processes as well as in responses to environmental stimuli (Schwechheimer et al., 2022; Hussain et al., 2021; Finkler et al., 2007; Shen et al., 2015; Hao et al., 2021; Abdullah-Zawawi et al., 2021). The presence of storage protein regulatory elements in *CV* promoters is consistent with a role of these genes during protein degradation processes occurring simultaneously to grain filling. Together these results indicate that although *CV1* and *CV2* may have functional redundancy, it is likely that these genes are specialized to participate in different biological processes.

Consistently, analysis of the promoter activities of *CV1* and *CV2* in Arabidopsis heterologous system showed significant differences in gene regulation. First, pro*CV1* was highly responsive to all stress conditions (salinity, hyperosmotic and hypoxia), both in leaves and in roots (Figure 3C), whereas pro*CV2* was only moderately activated in leaves under hypoxia (Figure 3D). In contrast, pro*CV2* exhibited earlier and higher activity than pro*CV1* under natural senescence (Figure 4B). Similarly to Arabidopsis and rice *CV* single genes, both *CV* promoters were responsive to dark-induced senescence, but only pro*CV2* activity was inhibited by CK under these conditions (Figure 5).

Marked differences in promoter activities were also observed after hormone treatments, where *CV1* promoter showed higher levels of hormone-induced activity in all cases (Figure 6). Remarkably, ABA treatment triggered *CV1* promoter activity, both in leaves and in roots, whereas *CV2* promoter was unresponsive. ABA regulation of *CV1* is consistent with Arabidopsis and rice expression profiles of *CV* genes (Peleg et al., 2011; Wang and Blumwald, 2014) and with a role for *CV1* in abiotic stress-induced senescence.

An interesting result was the auxin regulation of *CV* genes. Although both genes were upregulated in response to IAA treatment, the induction levels were significantly higher for *CV1* than *CV2* promoters. Moreover, IAA-induction of *CV1* promoter was observed in both leaves and roots, while only low levels of *CV2* promoter activity were detected in roots (Figure 6 and Figure S5). These results are consistent with the higher abundance of auxin response elements in *CV1* promoter compared to *CV2* promoter (Figure 3B).

Auxin is produced in young growing cells present in shoot tips, young leaves, and in developing flowers, seeds and roots (Ljung et al., 2002; Brumos et al., 2018). In addition, auxin accumulates in places where developmental

programmed cell death (dPCD) is taking place, including anther dehiscence, root cap shedding, xylem differentiation and organ senescence (Sheldrake, 2021). The observed promoter activity of *CV1* and *CV2* in the root tip, lateral root primordia and leaf serrations of young non-stressed plants coincides with tissues with high endogenous auxin accumulation. In addition, high *CV1* and *CV2* promoter activity was observed in the abscission zones of the transgenic *Arabidopsis* floral organs, stamens, petals, and sepals of flowers, corresponding to tissues undergoing senescence or dPCD.

The activity of *CV* promoters during natural senescence of the leaves, the flowers and the siliques is remarkably similar to the promoter activities of *BFN1*, *ORE1* and other NAC transcription factors in these organs (Matallana-Ramirez et al., 2013; Kim et al., 2014). Considering that binding sites for NAC transcription factors are present in both *CV* promoters and that there are no differences in the content of this particular cis-element, it could be speculated that NAC transcription factors might be upstream of *CV* expression during natural senescence.

The accumulation of GUS staining in the root tip and lateral root primordia for both *CV* promoters under non stress conditions (Figure 4A) suggests that *CV* proteins may be relevant for root development or architecture. It is interesting to note that this expression profile at the root tip overlaps to that of NAC transcription factors involved in dPCD control at the columella and lateral root cap, ANAC033 (SOMBRERO: SMB), ANAC087, and ANAC046 (Bennett et al., 2010; Fendrych et al., 2014; Huysmans et al., 2018). This type of PCD has been implicated in maintaining root cap organ size and position at the root tip which is important for meristem protection and root gravitropism (Kumpf and Nowack, 2015). Transcriptional activation at lateral root primordia is also coincident with activation of *ORE1* NAC transcription factor (ANAC092) involved in endodermis cell death and cell death marker genes (*BFN1*, *MC9*, *DMP4*, and *RNS3*, Farage-Barhom et al., 2008; Olivera-Carrillo et al., 2015; Escamez et al., 2020). Cell death at endodermis, cortex and epidermis is necessary for the elimination of cells overlying lateral root primordia (Wachsman and Benfey, 2020).

The auxin regulation of *CV* genes suggests that these genes are actively transcribed in auxin rich dying tissues, where they could participate in N remobilization as a consequence of plastid degradation. This supports the hypothesis of the auxin production in dying cells, proposed by Sheldrake (2021) that proposes that auxin accumulates in dying tissues as a breakdown product of tryptophan, which is released as a consequence of protein degradation during cell death.

Together, the expression analysis of *CV1* and *CV2* indicate that both genes are involved in developmental processes associated with cell death (leaf senescence, root and flower development, etc). However, there is a clear specialization of these genes. While *CV1* is primarily regulated by stress- stimuli and hormones (ABA, SA, etc), *CV2* is for the most involved in developmentally programmed senescence. Based on these results, *CV1* stands out as an interesting target for gene editing approaches for increasing tolerance to drought stress. The presence of two paralog specialized genes in soybean minimizes possible yield penalties that may derive from editing target genes with relevant roles in N mobilization processes.

CV pathway is a route that participates in the degradation of thylakoid and stromal proteins independently of autophagy or SAVs. CV protein contains a peptide for chloroplastic localization and only appears to be linked to the chloroplast and to the CCVs. CV silencing in *Arabidopsis* resulted in chloroplast stability during stress and enhanced stress tolerance (Wang and Blumwald, 2014). Sade et al. (2018) confirmed these observations in rice plants in which the *OsCV* gene was silenced. RNAi*OsCV* plants showed intact grana and were able to maintain primary N assimilation processes and displayed better yield performance under water-deficit conditions. Results revealed the role of CV in the turnover of enzymes that are associated with N assimilation during stress, leading to decreased N assimilation and affecting photorespiration. Direct interaction of *OsCV* and stromal GS2 was confirmed *in vivo* (Sade et al., 2018). Overall, the lines of evidence point to the idea that CV proteins play a significant role in chloroplast degradation and premature leaf senescence during stress and that CV silencing would enhance plant water stress tolerance by maintaining chloroplast function and C and N assimilation during stress conditions. Results concerning CV pathway fuels the idea that delaying stress-induced senescence by maintaining chloroplast stability is a viable strategy for enhancing grain yield under environmental stress.

In this work, we could confirm the role of *CV2* in chloroplast degradation, by analyzing the effect of conditional overexpression of *CV2*-FLAG fusions on the accumulation levels of specific chloroplast proteins. Under overexpression conditions, the levels of a PSI protein (PsaB) and two PSII proteins (D1 and PsbO) were significantly reduced, confirming a functional conservation of soybean *CV2*. Unfortunately we were not able to produce *CV1*-FLAG overexpressing lines. No *CV1*-FLAG protein was detected under inducible conditions in transgenic lines (T2) that had shown high accumulation of transgene mRNA in the T1 generation, despite the use of a β -estradiol inducible promoter (data not shown). This result may indicate a higher level of toxicity of *CV1* compared to *CV2*, or the occurrence of gene silencing in the *CV1* overexpressing lines resulting from promoter leakage. We speculate that, based

on the high similarity between CV1 and CV2 amino acid sequences, these proteins exert similar biological functions.

A search for CV orthologs and phylogenetic analysis in a number of plant species representative of the major plant families, revealed that CVs are only present in the genome of angiosperms, and that these genes exist since the earliest diverging angiosperm *Amborella trichopoda*. No CV orthologs were found in the genomes of gymnosperms or in any other tracheophyte or non vascular plant (Table S2-S5). This indicates that the CCV pathway is involved in biological functions that are restricted to angiosperms, such as flower development, specific aspects of vascular development or N-recycling mechanisms. Taking into account the developmental regulation of expression of CV genes, the CCV pathway may be a specific angiosperm pathway involved in dPCD.

Interestingly, except for *Cephalotus follicularis* (Oxalidales) and *Genlisea aurea* (Lamiales) species, most carnivorous plants from different orders including Poales (*Paepalanthus*, *Catopsis*, *Brocchinia*), Oxalidales (*Cephalotus*), Caryophyllales (*Drosera*, *Aldrovanda*, *Dionaea*, *Nepenthes*, *Drosophyllum*, *Triphyophyllum*), Ericales (*Roridula*, *Darlingtonia*, *Heliamphora*, *Sarracenia*), and Lamiales (*Philcoxia*, *Byblis*, *Ibicella*, *Proboscidea*, *Pinguicula*, *Genlisea*, *Utricularia*), lack CV orthologs. Carnivorous plants fix C from photosynthesis but absorb N and phosphorus from animal prey, helping them to survive and compete successfully in low-nutrient environments (Lin et al., 2021). The fact that most carnivorous plants lack CV genes supports the relevance of CCV pathway in endogenous N mobilization in non-carnivorous angiosperms.

Attempts have been carried out to produce plants with delayed senescence. Several lines of research have pointed to proteins related to autophagy, SAVs, and ATI-PS as potential targets to delay senescence, in most cases with unsatisfying results. Accelerated senescence has been observed in several autophagy-deficient mutants. (Doelling et al., 2002; Hanaoka et al., 2002; Thompson et al., 2005; Phillips et al., 2008; Li et al., 2015). In the same direction, Arabidopsis ATI-KD mutants (in which ATI-1 is knocked out and ATI-2 is silenced; Honig et al., 2012) exhibit accelerated senescence under salt stress conditions (Michaeli et al., 2014). Despite being the main protease accumulated in the senescent leaves of *A. thaliana* and *Brassica napus* (Desclos et al., 2008; Poret et al., 2016), it has been observed that sag12 KO mutants do not show an altered senescence phenotype (James et al., 2018). However, the sag12 mutants show lower yield and N content in the seed when they grow under N restriction (James et al., 2019). Our results concerning the CCV pathway in soybean, suggest that editing CV1 in this plant may be a promising strategy to delay stress-induced senescence without compromising natural senescence.

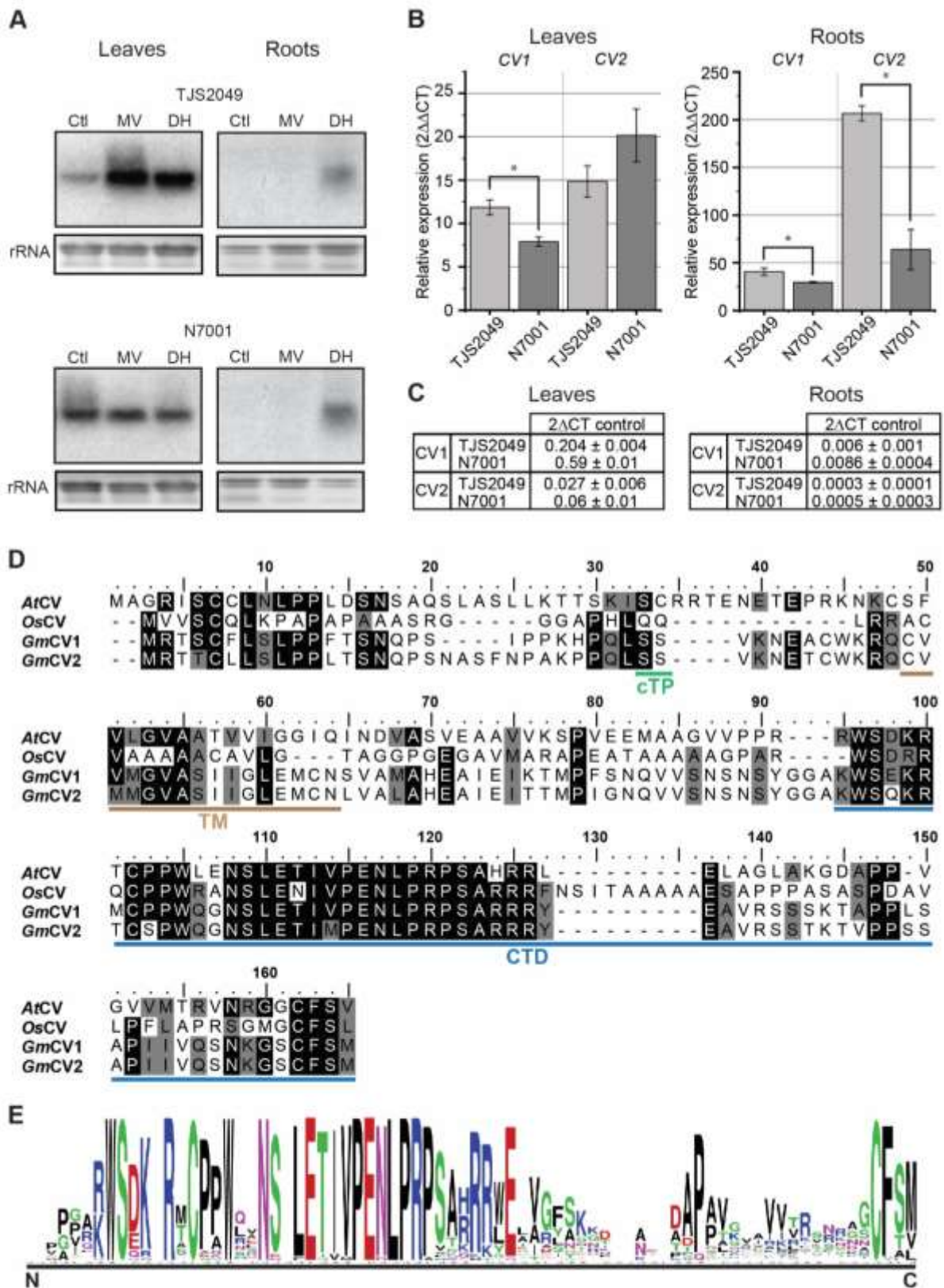


Figure 1. A CV transcript accumulation in the leaves and the root of soybean plants at V2 stage. Soybean genotypes TJS2049 (drought sensitive) and N7001 (drought tolerant) were used. One day treatment with MV 1 mM was performed. For dehydration treatment (DH) water was withdrawn until 50 % substrate water

retention capacity was reached. Total RNA was extracted from untreated control plants (Ctl) or treated plants. Ten μg of RNA were analyzed by Northern blot using a ^{32}P -labeled hybridization probe corresponding to a sequence spanning the positions nt. 111 to nt. 593 of *CV1* gene was used as a probe for *CV1* and *CV2* genes. Ethidium bromide staining of ribosomal RNA (rRNA) was used to ensure equal loading of RNA samples. **B.** RT-qPCR analysis of *CV* genes under DH condition. Transcript accumulation of each gene was normalized relative to the constitutively expressed *Elongation Factor 1 B* (Glyma.02G276600). Each data point is the mean value of three biological replicates. Two technical replicates were used for each sample. **C.** Relative expression of *CV* transcripts ($2^{-\Delta\text{CT}}$) with respect to *Elongation Factor 1 B* (Glyma.02G276600) in control condition in the leaves and the root is indicated. **D.** Alignment of GmCV with AtCV proteins was performed using ClustalW. Cleavage site for chloroplast localization transit peptide predicted using TargetP2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>) is indicated in green (cTP). Transmembrane domain predicted by LOCALIZER (<https://localizer.csiro.au/>) is indicated in brown (TM) and conserved C-terminal domain (CTD) is indicated in blue. Both cTP and TM and coincide with the ones predicted for AtCV by Wang and Blumwald (2014). **E.** Conserved C-terminal domain logo was done using weblogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) and all the *CV* proteins retrieved from phytozome.

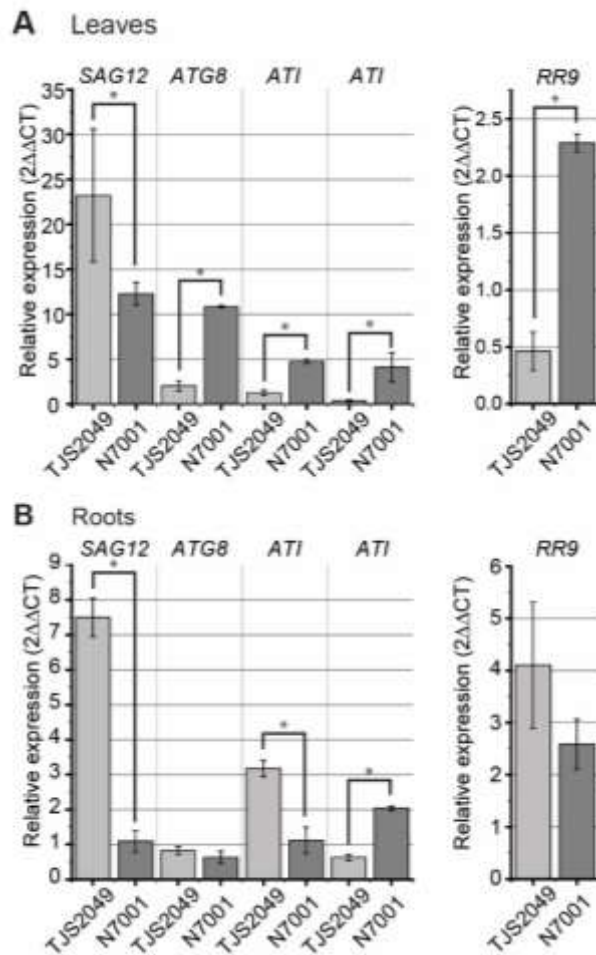


Figure 2. RT-qPCR analysis of *SAG12* (Glyma.17G239000), *ATG8* (Glyma.11G031800), *ATI-1* (Glyma.18G234100 and Glyma.09G258600) marker genes and CK responsive gene, *RR9*. (Glyma.11G155100) under DH condition in the leaves (A) or the root (B) of soybean sensitive (TJS2049) and tolerant (N7001) plants at V2 stage. Transcript accumulation of each gene was normalized relative to the constitutively expressed *Elongation Factor 1 B* (Glyma.02G276600). Each data point is the mean value of three biological replicates. Two technical replicates were used for each sample.

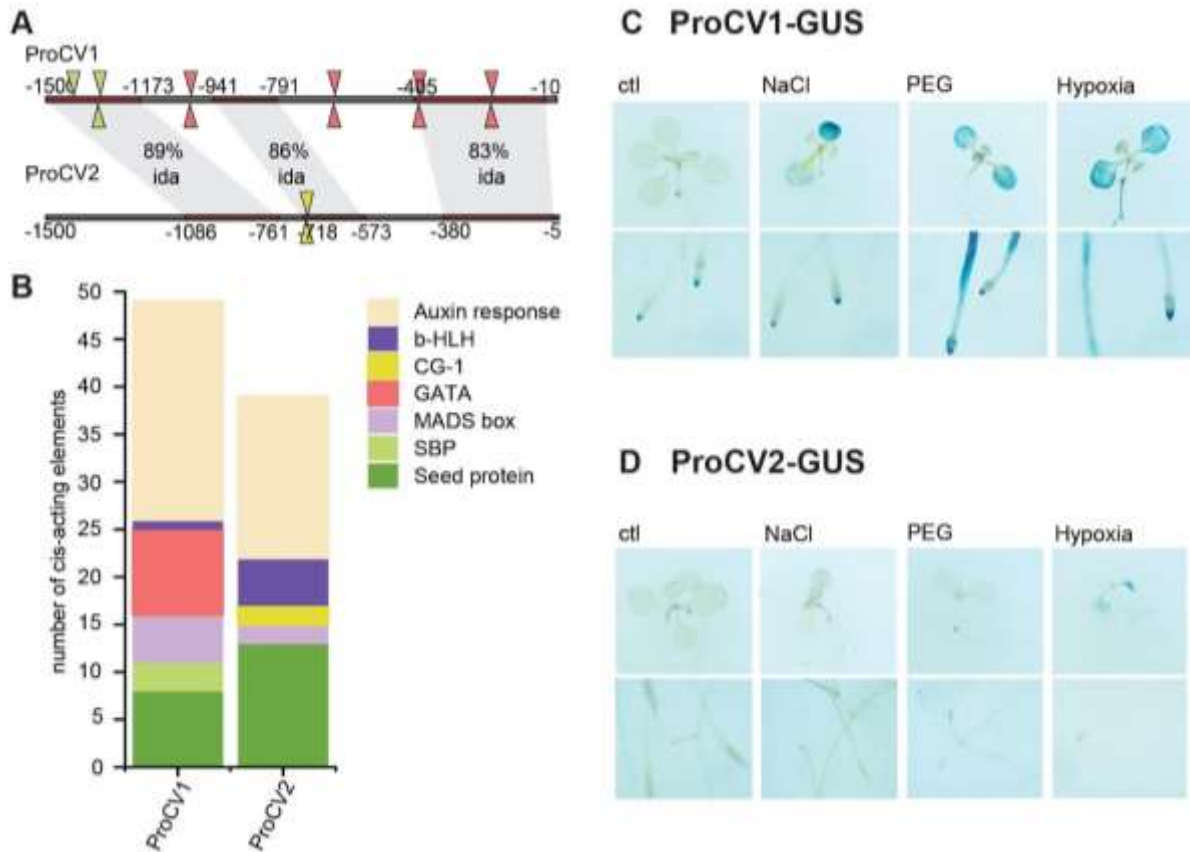


Figure 3. **A.** CV1 and CV2 1500 bp promoter were aligned using Align Sequences Nucleotide BLAST tool at NCBI website. Three regions with high identity were observed. Identity among these regions is shaded. Two diverging sequences (indicated in gray) were also observed. **B.** Cis-acting elements in the promoter regions were analyzed using PlantPAN3.0 (Chow et al., 2019). Elements only present on either ProCV1 or ProCV2 are indicated. **C** and **D.** GUS staining of 10 day old transgenic plants containing ProCV1-GUS (C) or ProCV2-GUS (D) constructs subjected to 3 day stress treatment. Five to 7-day-old *in vitro* grown seedlings were transferred to Petri dishes containing MS supplemented with 150 mM NaCl, 40 % PEG 8000-infused agar plates or liquid MS with no air pumping.

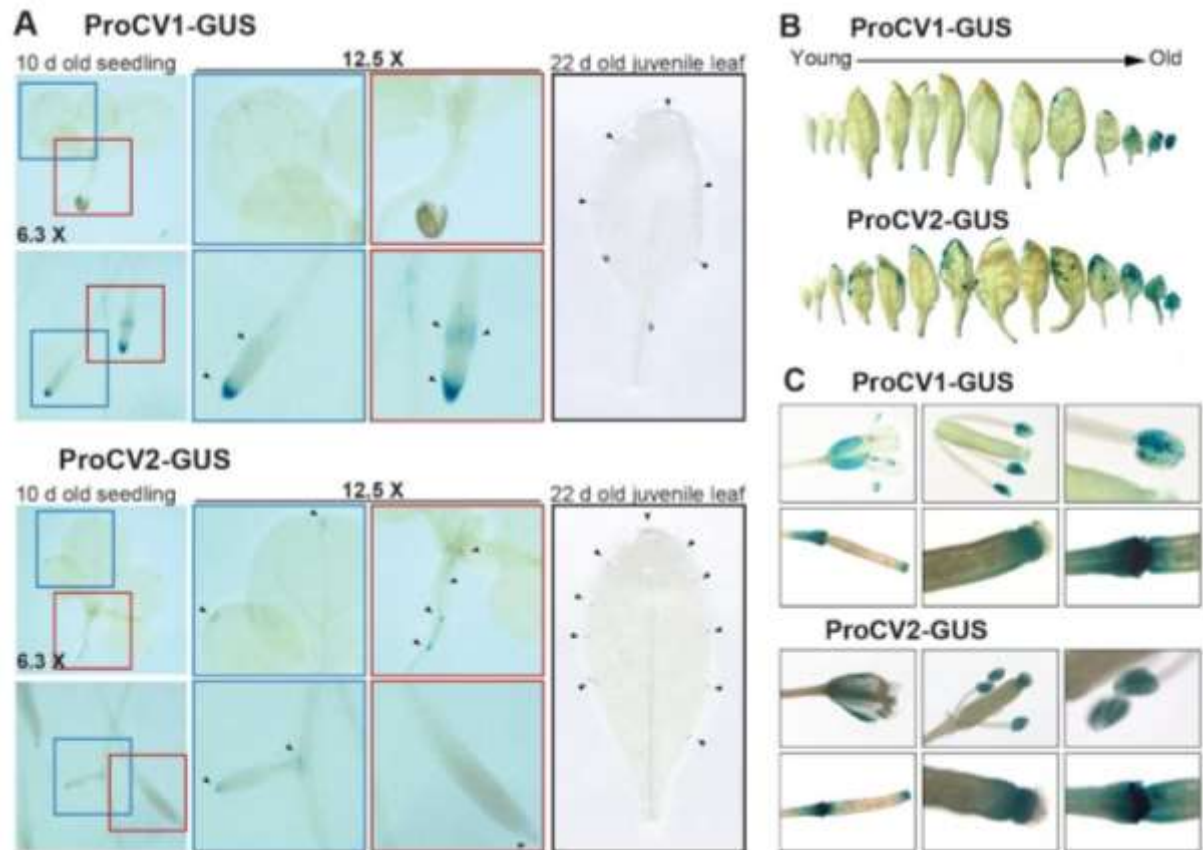


Figure 4. **A.** GUS staining of 10 day old seedling and 22-day-old juvenile leaf from untreated control plants containing ProCV1-GUS or ProCV2-GUS constructs. **B** GUS staining of cassette leaves from 40-day-old transgenic plants containing ProCV1-GUS or ProCV2-GUS constructs. **C.** GUS staining of flowers and siliques from transgenic plants containing ProCV1-GUS or ProCV2-GUS constructs.

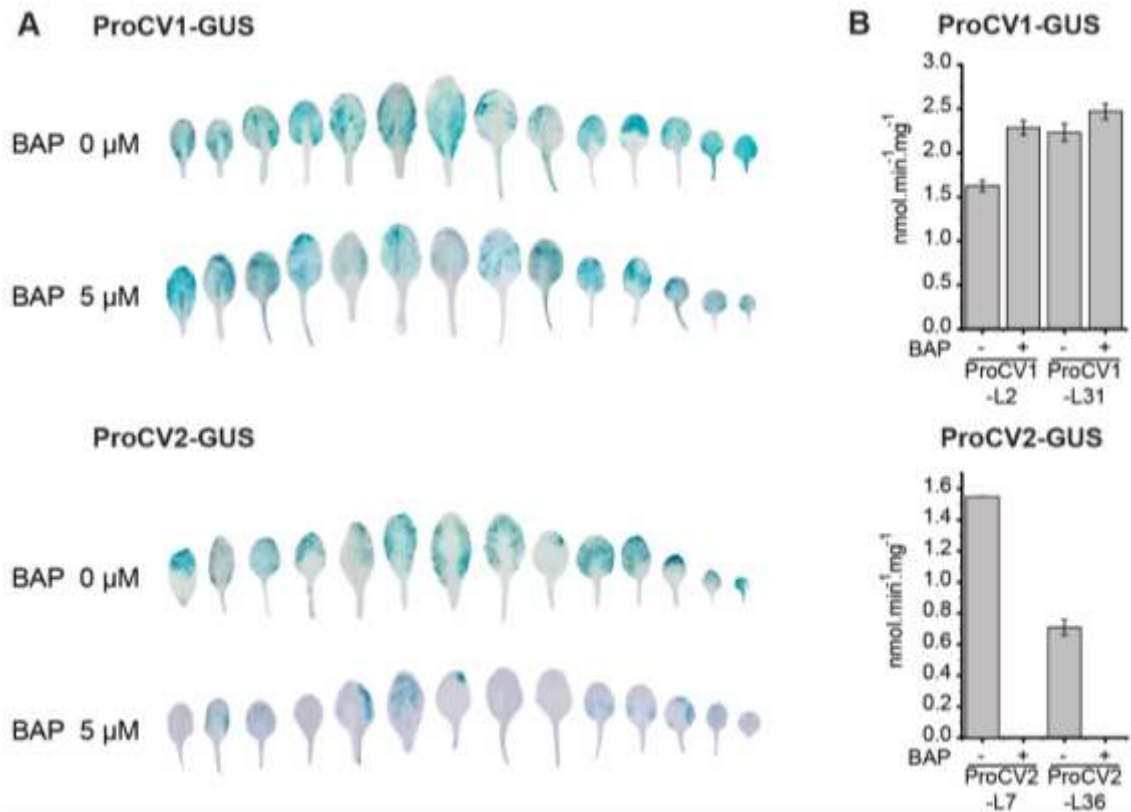
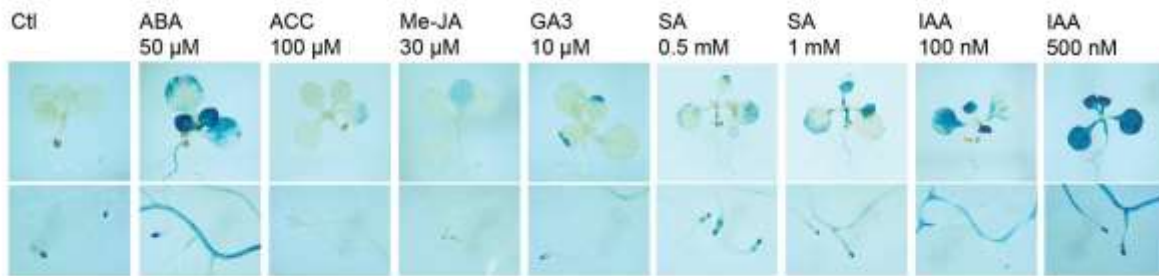


Figure 5. A GUS staining of cassette leaves from 22-day-old transgenic plants containing ProCV1-GUS or ProCV2-GUS constructs, subjected to 5 day light deprivation treatment, in the presence or absence of cytokinin (5 μM BAP). Seven-day-old in vitro grown seedlings were transferred to peat moss and grown for 10 more days. Plants were transferred to the dark for 5 days and were both watered and sprayed with 5 μM BAP or water during this period. **B.** GUS specific activity measured by MUG fluorescent assay in leaf samples from the same plants as in A.

A ProCV1-GUS



B ProCV2-GUS

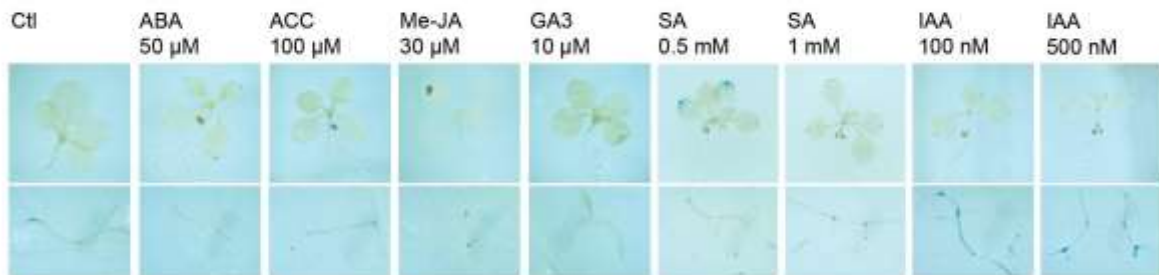


Figure 6. GUS staining of 7 day old transgenic seedlings containing ProCV1-GUS or ProCV2-GUS constructs subjected hormone treatment for 4 hours. Five to 7-day-old *in vitro* grown seedlings were transferred to Petri dishes containing MS supplemented with 50 μ M ABA (abscisic acid), 100 μ M ACC (aminocyclopropane-1-carboxylic acid), 10 μ M gibberellin (GA3), 0 to 2 mM salicylic acid (SA) or 0 to 1 μ M indole acetic acid (IAA). For methyl jasmonate (Me-JA) treatment, a cotton swab embedded in a 30 μ M Me-JA solution was introduced into the plate and this one was tightly sealed with plastic wrap.

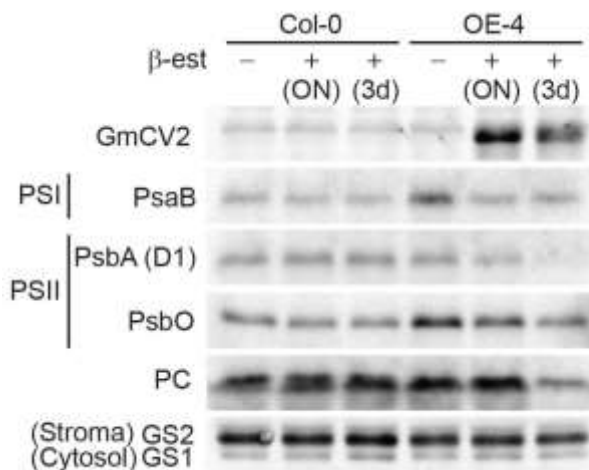


Figure 7. Chloroplast protein degradation in CV2-FLAG OE plants. Immunoblot analysis of CV-FLAG and chloroplast proteins in Col-0 and OE plants with or without β -estradiol treatment. Seven-day-old transgenic plants containing XVE-CV2-FLAG construct or wild type Col-0 plants were transferred to Petri dishes containing MS supplemented with 5 μ M β -estradiol or DMSO as control.

Fleitas et al., en redacción

Chloroplast proteins include PSI subunit PsaB, PSII subunits PsbA (D1) and PsbO1, and stromal proteins plastocyanin (PC) and GS2. Cytosol protein is GS1.

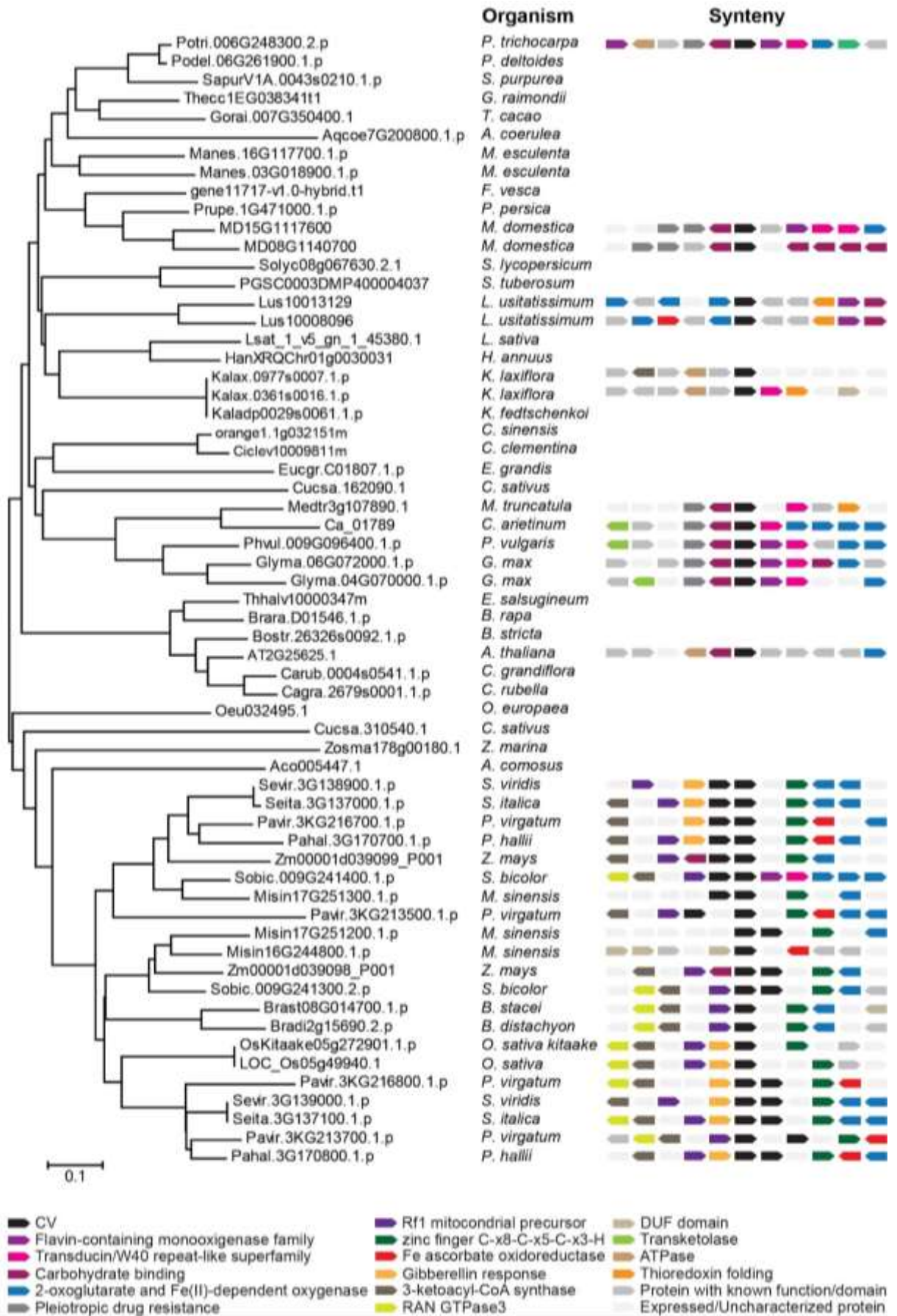
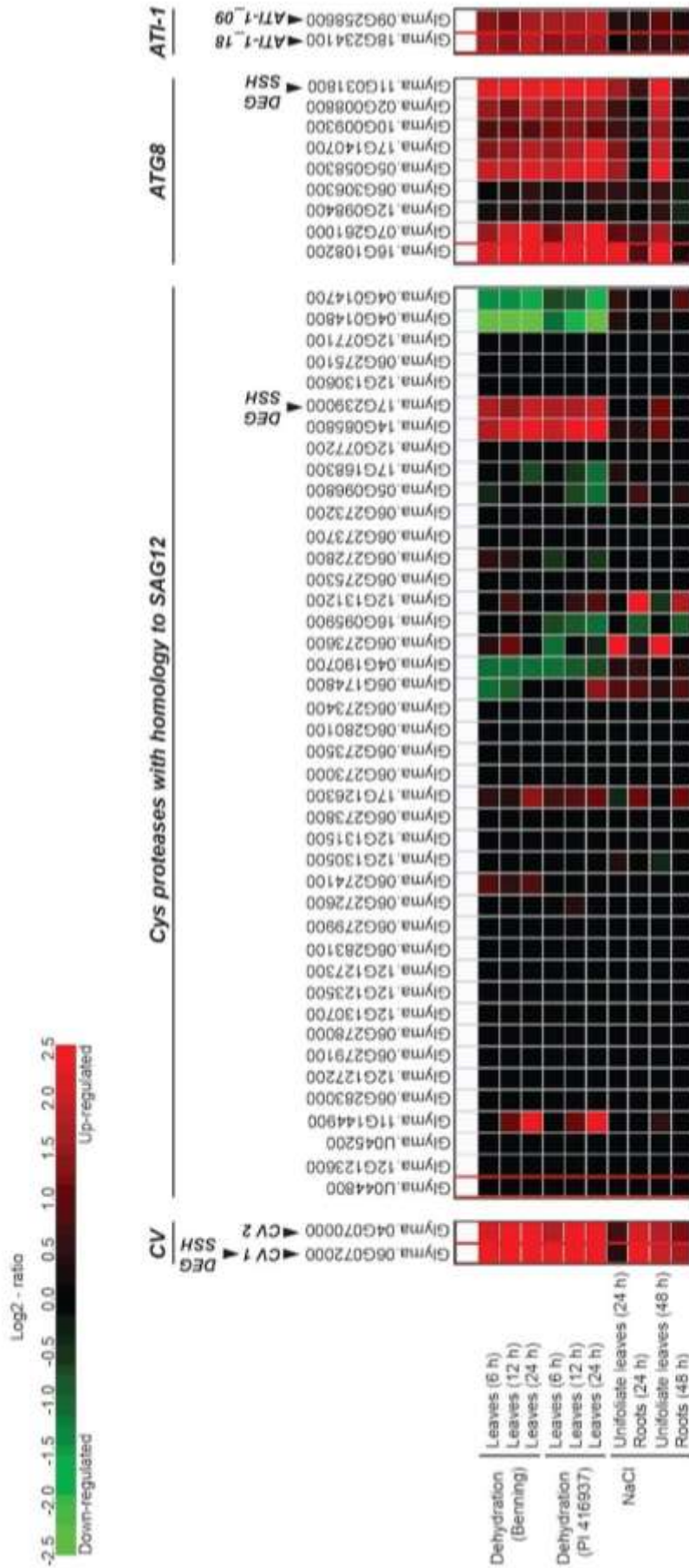


Figure S1. Phylogenetic and synteny analysis of CV proteins from angiosperm plants: (*Glycine max*), *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides*, *Sarracenia purpurea*, *Gossypium raimondii*, *Theobroma cacao*, *Aquilegia coerulea*, *Manihot esculenta*, *Fragaria vesca*, *Prunus persica*, *Malus domestica*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Linum usitatissimum*, *Lactuca sativa*, *Helianthus annuus*, *Kalanchoe laxiflora*, *Kalanchoe fedtschenkoi*, *Camellia sinensis*, *Citrus clementina*, *Eucalyptus grandis*, *Cucumis sativus*, *Medicago truncatula*, *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Eutrema salsugineum*, *Brassica rapa*, *Boechera stricta*, *Arabidopsis thaliana*, *Capsella grandiflora*, *Capsella rubella*, *Olea europaea*, *Zostera marina*, *Ananas comosus*, *Setaria viridis*, *Setaria italica*, *Panicum virgatum*, *Panicum hallii*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Miscanthus sinensis*, *Brachypodium stacei*, *Brachypodium distachyon* and *Oryza sativa*. Full-length amino acid sequences were aligned by the ClustalW and a phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method using MEGA version 6. Accession numbers of the genes are indicated in the figure.

The two GmCV genes locate next to each other and display a similar synteny between them and with respect to CV proteins in other legume species, which indicates that they were generated by gene duplication.

Figure S2 (downwords). Expression data of genes encoding representative members of autophagy, SAVs and ATI-PS pathways available at Genevestigator (Hruz et al 2008).



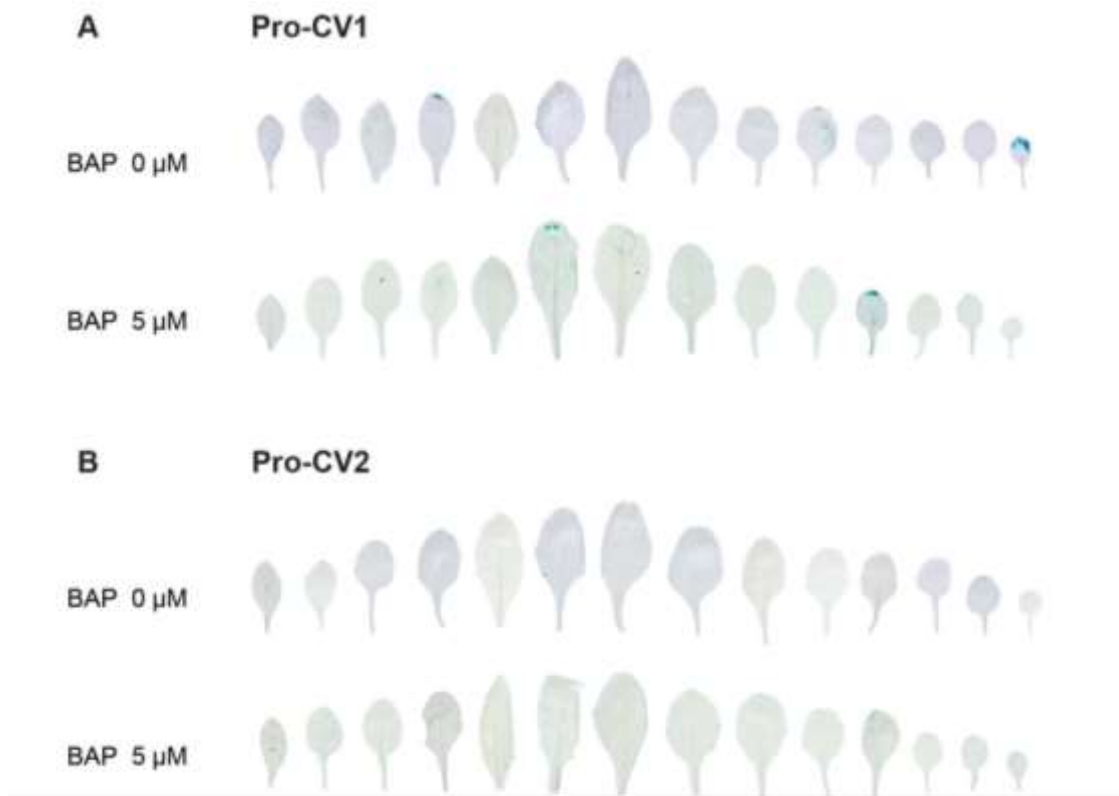


Figure S3. GUS staining of cassette leaves from 22-day-old transgenic plants containing ProCV1-GUS or ProCV2-GUS constructs, in the presence or absence of cytokinin (5 μM BAP). Control plants kept in the light for experiment in Figure 5. **A.** Control for ProCV1-GUS transgenic plants. **B.** Control for ProCV2-GUS transgenic plants

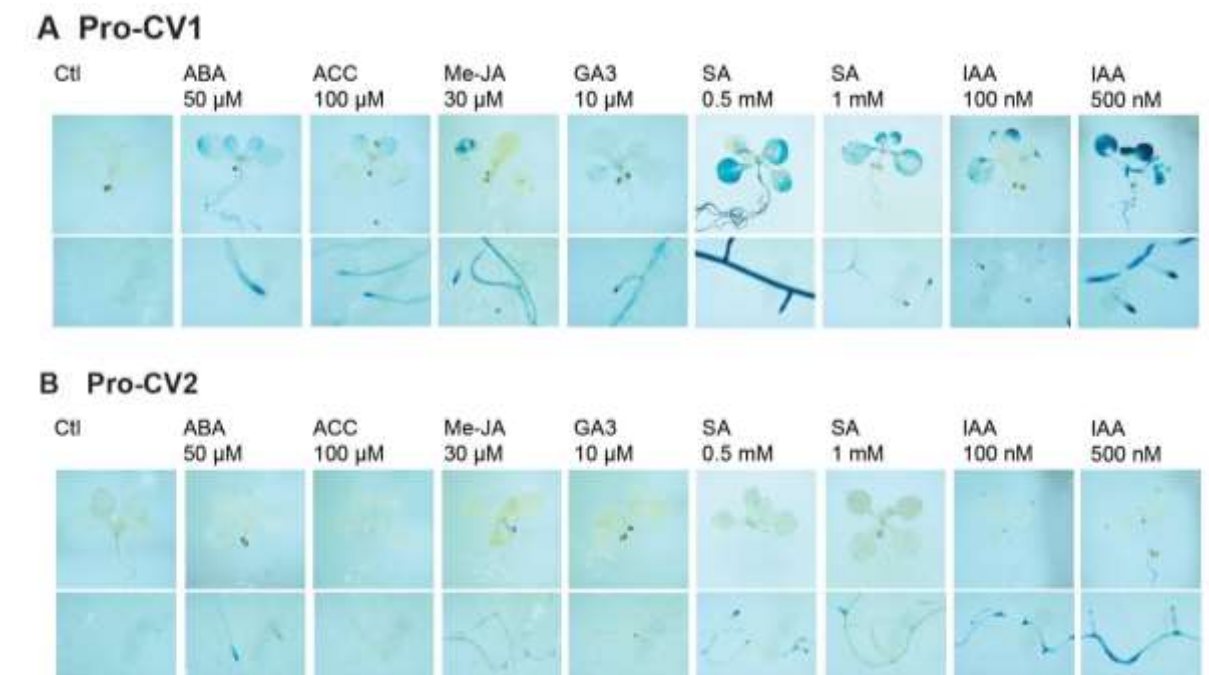


Figure S4. GUS staining of 7 day old transgenic seedlings containing ProCV1-GUS or ProCV2-GUS constructs subjected hormone treatment 24 hours. Five to 7-day-old *in vitro* grown seedlings were transferred to Petri dishes containing MS supplemented with 50 μ M ABA (abscisic acid), 100 μ M ACC (aminocyclopropane-1-carboxylic acid), 10 μ M gibberellin (GA3), 0 to 2 mM salicylic acid (SA) or 0 to 1 μ M indole acetic acid (IAA). For methyl jasmonate (Me-JA) treatment, a cotton swab embedded in a 30 μ M Me-JA solution was introduced into the plate and this one was tightly sealed with plastic wrap.

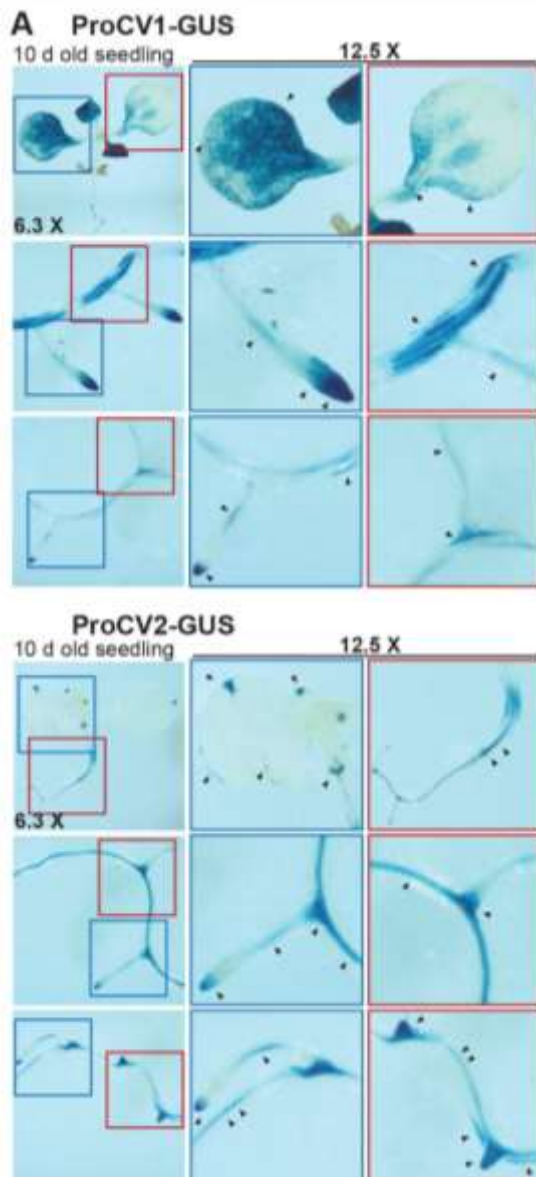


Figure S5. GUS staining of 10 day old seedling containing ProCV1-GUS or ProCV2-GUS constructs treated with 100 μ M IAA overnight.

Table S1. Primers employed in RT-qPCR experiments

| Gene | Primer name | Sequence 5'-3' |
|---------------|--------------------|--------------------------|
| CV1 | F-Gly.06G072000 | TCAAACCAACCTTCCATTCC |
| | R-Gly.06G072000 | CATTGCCACTGAATTGCACA |
| CV2 | F-Gly.04G070000 | CCAAATGGAGCCAGAAAAGA |
| | R-Gly.04G070000 | ACAGTCTTGGTGGAGGAACG |
| ATG8 | F-Gly.11G031800 | ATGTGATCCGCAAAGGATT |
| | R-Gly.11G031800 | AGAAACCCATCCTCGTCCTT |
| SAG12 | F-Gly.17G239000 | TGTCCTCTTGAGGGTGCTTC |
| | R-Gly.17G239000 | GCCTTAATGCCTTCACTCCA |
| ATI1/2 | F-Gly.18G234100 | CAGCTGCTGTGATGGGTCT |
| | R-Gly.18G234100 | TGCCACCAACAATCACATCT |
| GmRR5 | F-Gly.09G258600 | GCTCCTTCGCAGATCATTTCC |
| | R-Gly.09G258600 | GGAGCAGCTGCATATGTTGA |
| GmRR9 | F-Gly.05G033000 | ACGGTTGTGGAGAGTGGAAC |
| | R-Gly.05G033000 | GGCATGGAATAATCCGTCAT |
| IPT | F-Gly.11G155100 | AGCCTCCTCCCTGTATTGC |
| | R-Gly.11G155100 | CCTTGATCTTTCTCAGCAG |
| AR-GH3 | F-Gly.10G025300 | TGTTTCTGGTTCTGGGCTTC |
| | R-Gly.10G025300 | AAGTCCTTCCCACCAAAC |
| Act11 | F- Gly.05G101300 | CGTGATTTACTGGGAGCTCT |
| | R- Gly.05G101300 | GTTCCATTCTTCACCACACG |
| ELF1B | F-Gly.18G290800 | ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC |
| | R-Gly.18G290800 | GCTGGTCCTGGCTGTCTCC |
| ELF1B | F-Gly.02G276600 | GTTGAAAAGCCAGGGGACA |
| | R-Gly.02G276600 | TCTTACCCCTTGAGCGTGG |

Table S2. Number of CV genes. *Mpo*: *Marchantia polymorpha*, *Ppa*: *Pyscomitrium pattens*, *Sfa*: *Sphagnum fallax*, *Smo*: *Selaginella moellendorffii*, *Pta*: *Pinus taeda*, *Pbr*: *Pinus brutia*, *Pha*: *Pinus halepensis* subsp *Brutia*, *Pta*: *Pinus tabulaeformis*, *Pla*: *Pinus laricio* Savi, *Pma*: *Pinus marítima*, *Pra*: *Pinus radiata*, *Gmo*: *Gnetum montanum*, *Gpa*: *Gnetum parvifolium*, *Ggn*: *Gnetum gnemon*, *Gha*: *Gnetum haianense*, *Gpe*: *Gnetum pendulum*, *Glu*: *Gnetum luofuense*, *Gma*: *Gnetum macrostachium*, *Gaf*: *Gnetum africanum*, *Gla*: *Gnetum latifolium*, *Ggn*: *Gnetum gneumonoides*, *Gul*: *Gnetum ula*, *Cmi*: *Cycas micholitzii*, *Gbi*: *Ginkgo biloba*, *Bdi*: *Brachypodium distachyon*, *Osa*: *Oryza sativa*, *Pha*: *Panicum hallii*; *Pvi*: *Panicum virgatum*, *Sit*: *Setaria italica*, *Svi*: *Setaria viridis*, *Sbi*: *Sorghum bicolor*, *Zma*: *Zea mays*, *Sly*: *Solanum lycopersicum*, *Kfe*: *Kalanchoe fedtschenkoi*, *Kla*: *Kalanchoe laxiflora*, *Egr*: *Eucalyptus grandis*, *Lus*: *Linum usitatissimum*, *Mes*: *Manihot esculenta*, *Ptr*: *Populus trichocarpa*, *Csi*: *Citrus sinensis*, *Ath*: *Arabidopsis thaliana*, *Csa*: *Cucumis sativus*, *Fve*: *Fragaria vesca*; *Gma*: *Glycine max*, *Mdo*: *Malus domestica*, *Mtr*: *Medicago truncatula*, *Pvu*: *Phaseolus vulgaris*, *Ppe*: *Prunus persica*, *Tpr*: *Trifolium pratense*, *Cre*: *Chlamydomonas reinhardtii*.

| Node | Cre | | Mpo | | Ppa | | Sfa | | Smo | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Chlorophyte | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Embriophyte | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Trachophyte | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| Node | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>G</i> | <i>C</i> | <i>G</i> | |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---|
| | <i>ab</i> | <i>gl</i> | <i>si</i> | <i>pi</i> | <i>sy</i> | <i>ta</i> | <i>br</i> | <i>ha</i> | <i>ta</i> | <i>la</i> | <i>ma</i> | <i>ra</i> | <i>mo</i> | <i>pa</i> | <i>gn</i> | <i>ha</i> | <i>pe</i> | <i>lu</i> | <i>ma</i> | <i>af</i> | <i>la</i> | <i>gn</i> | <i>ul</i> | <i>mi</i> | <i>bi</i> | |
| Embriophyte | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Trachophyte | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gymnosperm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pinaceae | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gnetidae | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cycadidae | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ginkgoideae | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| Node | <i>Bdi</i> | <i>Osa</i> | <i>Pha</i> | <i>Pvi</i> | <i>Sit</i> | <i>Svi</i> | <i>Sbi</i> | <i>Zma</i> | <i>Sly</i> | <i>Kfe</i> | <i>Kla</i> | <i>Egr</i> | <i>Lus</i> | <i>Mes</i> | <i>Ptr</i> | <i>Csi</i> | <i>Ath</i> |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Angiosperm | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Grass | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Panicoideae | | | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | | | | | | | | | |
| Eudicot | | | | | | | | | | 1 | 2 | | | | | | |
| Pentapetalae | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asterid | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | |
| Rosid | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| Malvidae | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Malpighiales | | | | | | | | | | | | | 2 | 2 | 1 | | |
| Citrus | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| Brassicaceae | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| Node | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | <i>Csa</i> | | <i>Fve</i> | | <i>Gma</i> | | <i>Mdo</i> | | <i>Mtr</i> | | <i>Pvu</i> | | <i>Ppe</i> | | <i>Tpr</i> |
| Fabidae | | | 1 | | 1 | | 2 | | 2 | | 1 | | 1 | | 1 | | 2 |
| Chlorophyte | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Table S3. DS: Drought Sensitive, DT: Drought Tolerant, SW: Slow wilting. UP: Up regulated, DW: Down regulated, C: Constant, ND: Not determined, LE: Low expression. Experimental conditions: **Genevestigator**: 6, 12 and 24 h dehydration treatment; **Shin et al., 2015**: R2 plants, 6, 12 and 24 h air dry treatment; **Ha et al., 2015**: V2 plants, 2 and 10 h air dry treatment, plant relative water content was 18% for W82 and 40% for DT2008; **Le et al., 2012**: V6 to R2 plants, 6 d water withholding, soil water content < 5%, leaf relative water content 60% of well watered plants; **Gallino et al., 2018**: V5 plants, water withholding to 50% or 25% soil water content.

| Gene | Locus name | Regulation | | | | |
|--------|------------|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| Source | | Genevestigator | Shin et al., 2015 | Ha et al., 2015 | Le et al., 2012 | Gallino et al., 2018 |
| | | | | | | |

| Genotype | | Benning (DS), PI416937 (SW) | Benning (DS), PI416937 (SW), | DT2008 (DT), Williams (DS) | Williams82 | TJS2049 (DS), N7001 (SW) |
|-----------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| Tissue | | Leaf | Leaf | Root | Leaf | Leaf |
| Method | | | Illumina seq | Affimetrix 66K | Affimetrix 66K | SSH |
| CV1 | Glyma.06G072000 | UP | UP | UP | UP | UP |
| CV2 | Glyma.04G070000 | UP | UP | C | UP | ND |
| ATG8 | Glyma.11G031800 | UP | UP | C | UP | UP |
| | Glyma.15G108200 | UP | UP | C | UP | ND |
| | Glyma.07G261000 | UP | UP | C | UP | ND |
| | Glyma.02G008800 | UP | UP | C | UP | ND |
| | Glyma.10G009300 | UP | UP | C | UP | ND |
| | Glyma.05G058300 | UP | UP | C | UP | ND |
| | Glyma.17G140700 | UP | UP | C | UP | ND |
| | Glyma.12G098400 | C | C | C | DW | ND |
| | Glyma.06G306300 | C | C | C | DW | ND |
| SAG12 | Glyma.14G085800 | UP | UP | UP | C | UP |
| | Glyma.17G239000 | UP | UP | UP | C | UP |
| | Glyma.11g144900 | UP | C | C | UP | ND |
| | Glyma.17G126300 | UP | LE, C | C | UP | ND |
| | Glyma.06G274100 | UP | ND | C | UP | ND |
| | Glyma.12g131200 | UP | ND | C | UP | ND |
| | Glyma.16G095900 | DW | LE, C | C | DW | ND |
| | Glyma.17G168300 | DW | LE, C | C | UP | ND |
| | Glyma.04G190700 | DW | LE, C | C | DW | ND |
| | Glyma.06G174800 | DW | C | C | DW | ND |
| | Glyma.04G014800 | DW | LE,C | C | DW | ND |
| | Glyma.06G273600 | UP(DS)/DW(DT) | LE, C | C | DW | ND |

| | | | | | | |
|---------------|-----------------|----|----|----|----|----|
| | Glyma.05g096800 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06G272600 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06g272800 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06g273000 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06g273200 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06g273400 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06g273500 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06G273700 | C | ND | C | UP | ND |
| | Glyma.06g273800 | C | ND | C | UP | ND |
| | Glyma.06g275100 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06g275300 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06G278000 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06G279100 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06g280100 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06G283000 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.06G283100 | C | ND | C | UP | ND |
| | Glyma.12G077100 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.12G077200 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.12g123500 | C | ND | C | UP | ND |
| | Glyma.12g123600 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.12g127200 | C | ND | C | UP | ND |
| | Glyma.12g127300 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.12g130500 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.12G130600 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.12g130700 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.12g131500 | C | ND | C | DW | ND |
| | Glyma.16g095900 | DW | ND | ND | ND | ND |
| | Glyma.U044800 | C | ND | ND | ND | ND |
| | Glyma.U045200 | C | ND | ND | ND | ND |
| ATI1/2 | Glyma.18G234100 | UP | UP | C | DW | ND |
| | Glyma.09G258600 | UP | UP | C | DW | ND |

REFERENCES

1. Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta*. 2003 Mar;216(5):841-53. doi: 10.1007/s00425-002-0937-8.
2. Abdel-Haleem H, Carter TE, Purcell LC, King CA, Ries LL, Chen P, et al. Mapping of quantitative trait loci for canopy-wilting trait in soybean (*Glycine max* L. Merr). *Theor Appl Genet*. 2012;125(5):837–46. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22566068/>.
3. Abdullah-Zawawi MR, Ahmad-Nizammuddin NF, Govender N, Harun S, Mohd-Assaad N, Mohamed-Hussein ZA. Comparative genome-wide analysis of WRKY, MADS-box and MYB transcription factor families in *Arabidopsis* and rice. *Sci Rep*. 2021 Oct 4;11(1):19678. doi: 10.1038/s41598-021-99206-y.
4. Aoyama S, Huarancca Reyes T, Guglielminetti L, Lu Y, Morita Y, Sato T, Yamaguchi J. Ubiquitin ligase ATL31 functions in leaf senescence in response to the balance between atmospheric CO₂ and nitrogen availability in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 2014 Feb;55(2):293-305. doi: 10.1093/pcp/pcu002.
5. Avila-Ospina, L.; Moison, M.; Yoshimoto, K.; Masclaux-Daubresse, C. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *J. Exp. Bot*. 2014, 65, 3799–3811.
6. Balazadeh S, Parlitz S, Mueller-Roeber B, Meyer RC. Natural developmental variations in leaf and plant senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)*. 2008 Sep;10 Suppl 1:136-47. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00108.x.
7. Bazzzer SK, Purcell LC. Identification of quantitative trait loci associated with canopy temperature in soybean. *Sci. Reports* 2020;10(1):1–11. <https://www.nature.com/articles/s41598-020-74614-8>.
8. Bennett T, van den Toorn A, Sanchez-Perez GF, Campilho A, Willemsen V, Snel B, Scheres B. SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2010 Mar;22(3):640-54. doi: 10.1105/tpc.109.072272.
9. Brumos J, Robles LM, Yun J, Vu TC, Jackson S, Alonso JM, Stepanova AN. Local Auxin Biosynthesis Is a Key Regulator of Plant Development.

- Dev Cell. 2018 Nov 5;47(3):306-318.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.09.022.
10. Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *Plant J.* 2005 May;42(4):567-85. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02399.x.
 11. Buet A, Costa ML, Martínez DE, Guiamet JJ. Chloroplast Protein Degradation in Senescing Leaves: Proteases and Lytic Compartments. *Front Plant Sci.* 2019 Jun 19;10:747. doi: 10.3389/fpls.2019.00747.
 12. Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Francia E, Mare C, Tondelli A, Stanca AM. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.* 2008 105: 1-14. doi:10.1016/j.fcr.2007.07.004.
 13. Chamarthi SK, Kaler AS, Abdel-Haleem H, Fritschi FB, Gillman JD, Ray JD, et al. Identification and Confirmation of Loci Associated With Canopy Wilting in Soybean Using Genome-Wide Association Mapping. *Front Plant Sci.* 2021;0:1371. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.698116>.
 14. Chang TG, Zhu XG, Raines C. Source-sink interaction: a century old concept under the light of modern molecular systems biology. *J Exp Bot.* 2017 Jul 20;68(16):4417-4431. doi: 10.1093/jxb/erx002.
 15. Charlson DV, Bhatnagar S, King CA, Ray JD, Sneller CH, Carter TE Jr, Purcell LC. Polygenic inheritance of canopy wilting in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Theor Appl Genet.* 2009 Aug;119(4):587-94. doi: 10.1007/s00122-009-1068-4.
 16. Carter TE, Burton JW, Bowman DT, Cui Z, Zhou X, Villagarcia MR, et al. Registration of 'N7001' soybean. *Crop Sci.* 2003 43: 1125–1126. Doi: 10.2135/cropsci2003.1126
 17. Chaudhary J., Shivaraj S., Khatri P., Ye H., Zhou L., Klepadlo M., Nguyen HT. (2019). Approaches, Applicability, and Challenges for Development of Climate-Smart Soybean. *Genomic Designing of Climate-Smart Oilseed Crops*, 1–74. doi:10.1007/978-3-319-93536-2_1
 18. Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T. Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by

- specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 2003 Sep;44(9):914-21. doi: 10.1093/pcp/pcg118.
19. Chow CN, Lee TY, Hung YC, Li GZ, Tseng KC, Liu YH, Kuo PL, Zheng HQ, Chang WC. PlantPAN3.0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D1155-D1163. doi: 10.1093/nar/gky1081.
 20. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1998 Dec;16(6):735-43. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x.
 21. Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 1985 Jul 11;13(13):4777-88. doi: 10.1093/nar/13.13.4777.
 22. Desclos M, Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Bonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice JC. A combined ¹⁵N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics.* 2009 Jul;9(13):3580-608. doi: 10.1002/pmic.200800984.
 23. Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry JF, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. *Plant Physiol.* 2005 Jun;138(2):898-908. doi: 10.1104/pp.105.060764.
 24. Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):33105-14. doi: 10.1074/jbc.M204630200.
 25. Escamez S, André D, Sztojka B, Bollhöner B, Hall H, Berthet B, Voß U, Lers A, Maizel A, Andersson M, Bennett M, Tuominen H. Cell Death in Cells Overlying Lateral Root Primordia Facilitates Organ Growth in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 2020 Feb 3;30(3):455-464.e7. doi: 10.1016/j.cub.2019.11.078.
 26. Evert RF (2006a) Parenchyma and collenchyma. In: Esau's plant anatomy. Meristems, cells and tissues of the plant body: their structure, function and development. Wiley-Interscience, Hoboken, pp 175–190.

27. Farage-Barhom S, Burd S, Sonogo L, Perl-Treves R, Lers A. Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes. *J Exp Bot.* 2008;59(12):3247-58. doi: 10.1093/jxb/ern176.
28. Fauteux F, Strömvik MV. Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae and Poaceae. *BMC Plant Biol.* 2009 Oct 20;9:126. doi: 10.1186/1471-2229-9-126.
29. Fendrych M, Van Haute gem T, Van Durme M, Olvera-Carrillo Y, Huysmans M, Karimi M, Lippens S, Guérin CJ, Krebs M, Schumacher K, Nowack MK. Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in Arabidopsis. *Curr Biol.* 2014 May 5;24(9):931-40. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.025.
30. Fenta BA, Driscoll SP, Kunert HJ, Foyer CH. Characterization of drought-tolerance traits in nodulated soya beans: the importance of maintaining photosynthesis and shoot biomass under drought-induced limitations on nitrogen metabolism. *J. Agron Crop Sci* (2012) 198: doi: 92-103. 10.1111/j.1439-037X.2011.00491.x
31. Fenta BA, Beebe SE, Kunert HJ, Burr ridge JD, Barlow KM, Lynch JP, Foyer CH. Field phenotyping of soybean roots for drought stress tolerance. *Agronomy* (2014) 4: 418-435. doi: 10.3390/agronomy4030418.
32. Finkler A, Ashery-Padan R, Fromm H. CAMTAs: calmodulin-binding transcription activators from plants to human. *FEBS Lett.* 2007 Aug 21;581(21):3893-8. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.051.
33. Fujiwara T, Beachy RN. Tissue-specific and temporal regulation of a beta-conglycinin gene: roles of the RY repeat and other cis-acting elements. *Plant Mol Biol.* 1994 Jan;24(2):261-72. doi: 10.1007/BF00020166.
34. Gallino JP, Ruibal C, Casaretto E, Fleitas AL, Bonnacarrère V, Borsani O, Vidal S. A dehydration-induced eukaryotic translation initiation factor iso4G identified in a slow wilting soybean cultivar enhances abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *Front Plant Sci* (2018) 9:262. doi: 10.3389/fpls.2018.00262.
35. Gepstein S, Glick BR. Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Mol Biol.* 2013 Aug;82(6):623-33. doi: 10.1007/s11103-013-0038-z.

36. Gomez FM, Carrión CA, Costa ML, Desel C, Kieselbach T, Funk C, Krupinska K, Guiamet J. Extra-plastidial degradation of chlorophyll and photosystem I in tobacco leaves involving 'senescence-associated vacuoles'. *Plant J.* 2019 Aug;99(3):465-477. doi: 10.1111/tpj.14337.
37. Gong YH, Zhang J, Gao JF, Lu JY, Wang JR. Slow export of photoassimilate from stay-green leaves during late grain-filling stage in hybrid winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Agron Crop Sci.* 2005 191: 292-299. doi: 10.1111/j.1439-037X.2005.00173.x.
38. Guiboileau A, Avila-Ospina L, Yoshimoto K, Soulay F, Azzopardi M, Marmagne A, Lothier J, Masclaux-Daubresse C. Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in *Arabidopsis* leaves depending on nitrate availability. *New Phytol.* 2013 Aug;199(3):683-94. doi: 10.1111/nph.12307.
39. Ha CV, Watanabe Y, Tran UT, Le DT, Tanaka M, Nguyen KH, Seki M, Nguyen DV, Tran LS. Comparative analysis of root transcriptomes from two contrasting drought-responsive Williams 82 and DT2008 soybean cultivars under normal and dehydration conditions. *Front Plant Sci* (2015) 6:551. doi: 10.3389/fpls.2015.00551.
40. Hao Y, Zong X, Ren P, Qian Y, Fu A. Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transcription Factors Regulate a Wide Range of Functions in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 1;22(13):7152. doi: 10.3390/ijms22137152.
41. Honig A, Avin-Wittenberg T, Ufaz S, Galili G. A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of *Arabidopsis* plants to carbon starvation. *Plant Cell.* 2012 Jan;24(1):288-303. doi: 10.1105/tpc.111.093112.
42. Hörtensteiner S, Feller U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot.* 2002 Apr;53(370):927-37. doi: 10.1093/jexbot/53.370.927.
43. Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics.* 2008;2008:420747. doi: 10.1155/2008/420747.
44. Hussain Q, Asim M, Zhang R, Khan R, Farooq S, Wu J. Transcription Factors Interact with ABA through Gene Expression and Signaling

- Pathways to Mitigate Drought and Salinity Stress. *Biomolecules*. 2021 Aug 5;11(8):1159. doi: 10.3390/biom11081159.
45. Hufstetler EV, Boerma HR, Carter TE, Earl HJ. Genotypic Variation for Three Physiological Traits Affecting Drought Tolerance in Soybean. *Crop Physiol Met* 2007 47(1):25-35. doi: 10.2135/cropsci2006.04.0243
46. Huysmans M, Buono RA, Skorzinski N, Radio MC, De Winter F, Parizot B, Mertens J, Karimi M, Fendrych M, Nowack MK. NAC Transcription Factors ANAC087 and ANAC046 Control Distinct Aspects of Programmed Cell Death in the Arabidopsis Columella and Lateral Root Cap. *Plant Cell*. 2018 Sep;30(9):2197-2213. doi: 10.1105/tpc.18.00293.
47. Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T. Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol*. 2008 Sep;148(1):142-55. doi: 10.1104/pp.108.122770.
48. Islam MM, Ishibashi Y, Nakagawa AC, Tomita Y, Iwaya-Inoue M, Arima S, Zheng SH. Nitrogen redistribution and its relationship with the expression of GmATG8c during seed filling in soybean. *J Plant Physiol*. 2016 Mar 15;192:71-4. doi: 10.1016/j.jplph.2016.01.007.
49. Izumi M, Ishida H. The changes of leaf carbohydrate contents as a regulator of autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies during leaf senescence. *Plant Signal Behav*. 2011 May;6(5):685-7. doi: 10.4161/psb.6.5.14949.
50. James M, Masclaux-Daubresse C, Marmagne A, Azzopardi M, Laîné P, Goux D, Etienne P, Trouverie J. A new role for SAG12 cysteine protease in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* (2019) 9: doi: 10.3389/fpls.2018.01998.
51. James M, Poret M, Masclaux-Daubresse C, Marmagne A, Coquet L, Jouenne T, Chan P, Trouverie J, Etienne P. SAG12, a Major Cysteine Protease Involved in Nitrogen Allocation during Senescence for Seed Production in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 2018 Oct 1;59(10):2052-2063. doi: 10.1093/pcp/pcy125.
52. Karimi M, Inzé D, Depicker A. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*. 2002 May;7(5):193-5. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02251-3.

53. Kim HJ, Hong SH, Kim YW, Lee IH, Jun JH, Phee BK, Rupak T, Jeong H, Lee Y, Hong BS, Nam HG, Woo HR, Lim PO. Gene regulatory cascade of senescence-associated NAC transcription factors activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-mediated leaf senescence signalling in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 2014 Jul;65(14):4023-36. doi: 10.1093/jxb/eru112.
54. Kichey, T.; Hirel, B.; Heumez, E.; Dubois, F.; Le Gouis, J. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crop Res* 2007, 102, 22–32.
55. Klionsky DJ, Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:1-32. doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.1.
56. Klionsky DJ, Schulman BA. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Apr;21(4):336-45. doi: 10.1038/nsmb.2787.
57. Knoblauch M, van Bel AJE. Sieve tubes in action. *Plant Cell* (1998) 10: 35-50.
58. Kumpf RP, Nowack MK. The root cap: a short story of life and death. *J Exp Bot.* 2015 Sep;66(19):5651-62. doi: 10.1093/jxb/erv295.
59. Kunert K, Vorster BJ. In search for drought-tolerant soybean: is the slow-wilting phenotype more than just a curiosity? *J Exp Bot.* 2020 Jan 7;71(2):457-460. doi: 10.1093/jxb/erz235.
60. Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M, Ham le H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis. *PLoS One* (2012) 7(11):e49522. doi: 10.1371/journal.pone.0049522.
61. Li F, Vierstra RD. Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci.* 2012 Sep;17(9):526-37. doi: 10.1016/j.tplants.2012.05.006.
62. Lian S, Zhou Y, Liu Z, Gong A, Cheng L. The differential expression patterns of paralogs in response to stresses indicate expression and sequence divergences. *BMC Plant Biol.* 2020 Jun 16;20(1):277. doi: 10.1186/s12870-020-02460-x.

63. Lin Q, Ané C, Givnish TJ, Graham SW. A new carnivorous plant lineage (Triantha) with a unique sticky-inflorescence trap. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Aug 17;118(33):e2022724118. doi: 10.1073/pnas.2022724118.
64. Liu Y, Bassham DC. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol*. 2012;63:215-37. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105441
65. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
66. Ljun K, Hul AK, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen JD, Sandberg G. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 2002 Sep;50(2):309-32. doi: 10.1023/a:1016024017872.
67. Madoka Y, Tomizawa K, Mizoi J, Nishida I, Nagano Y, Sasaki Y. Chloroplast transformation with modified accD operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco. *Plant Cell Physiol*. 2002 Dec;43(12):1518-25. doi: 10.1093/pcp/pcf172.
68. Manuela D, Xu M. Juvenile Leaves or Adult Leaves: Determinants for Vegetative Phase Change in Flowering Plants. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 21;21(24):9753. doi: 10.3390/ijms21249753.
69. Marquez-Garcia B, Shaw D, Cooper JW, Karpinska B, Quain MD, Makgopa EM, Kunert K, Foyer CH. Redox markers for drought-induced nodule senescence, a process occurring after drought-induced senescence of the lowest leaves in soybean (*Glycine max*). *Ann Bot*. 2015 Sep;116(4):497-510. doi: 10.1093/aob/mcv030.
70. Marshall RS, Li F, Gemperline DC, Book AJ, Vierstra RD. Autophagic degradation of the 26S proteasome is mediated by the dual ATG8/ubiquitin receptor RPN10 in *Arabidopsis*. *Mol Cell* (2015): doi/10.1016/j.molcel.2015.04.023.
71. Martínez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui MS, Guiamet JJ. 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J*. 2008 Oct;56(2):196-206. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03585.x.
72. Matallana-Ramirez LP, Rauf M, Farage-Barhom S, Dortay H, Xue GP, Dröge-Laser W, Lers A, Balazadeh S, Mueller-Roeber B. NAC

- transcription factor ORE1 and senescence-induced BIFUNCTIONAL NUCLEASE1 (BFN1) constitute a regulatory cascade in Arabidopsis. *Mol Plant*. 2013 Sep;6(5):1438-52. doi: 10.1093/mp/sst012.
73. Méchin V, Damerval C, Zivy M. (2007) Total Protein Extraction with TCA-Acetone. In: Thiellement H., Zivy M., Damerval C., Méchin V. (eds) *Plant Proteomics. Methods in Molecular Biology*, vol 355. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-227-0:1>
74. Mens C, Li D, Haaima LE, Gresshoff PM, Ferguson BJ. Local and Systemic Effect of Cytokinins on Soybean Nodulation and Regulation of Their Isopentenyl Transferase (IPT) Biosynthesis Genes Following Rhizobia Inoculation. *Front Plant Sci*. 2018 Aug 8;9:1150. doi: 10.3389/fpls.2018.01150.
75. Michaeli S, Honig A, Levanony H, Peled-Zehavi H, Galili G. Arabidopsis ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *Plant Cell*. 2014 Oct;26(10):4084-101. doi: 10.1105/tpc.114.129999.
76. Nakamura A, Higuchi K, Goda H, Fujiwara MT, Sawa S, Koshiba T, Shimada Y, Yoshida S. Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiol*. 2003 Dec;133(4):1843-53. doi: 10.1104/pp.103.030031.
77. Olvera-Carrillo Y, Van Bel M, Van Hautegeem T, Fendrych M, Huysmans M, Simaskova M, van Durme M, Buscaill P, Rivas S, Coll NS, Coppens F, Maere S, Nowack MK. A Conserved Core of Programmed Cell Death Indicator Genes Discriminates Developmentally and Environmentally Induced Programmed Cell Death in Plants. *Plant Physiol*. 2015 Dec;169(4):2684-99. doi: 10.1104/pp.15.00769.
78. Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guamet JJ. Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *Plant J*. 2005 Mar;41(6):831-44. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02346.x.
79. Pantalone, V. R., G. J. Rebetzke, J. W. Burton, and T. E. Carter Jr: Phenotypic evaluation of root traits in soybean and applicability to plant breeding. *Crop Sci*. 1996 36(2), 456–459. doi: 10.2135/cropsci1996.0011183X003600020039x
80. Pardo EM, Vellicce GR, Aguirrezabal L, Pereyra Irujo G, Rocha CML, García MG, Prieto Angueira S, Welin B, Sanchez J, Ledesma F,

- Castagnaro AP. Drought tolerance screening under controlled conditions predicts ranking of water-limited yield of field-grown soybean genotypes. *J Agron Crop Sci* (2014) 201: 95-104.
81. Peleg Z, Reguera M, Tumimbang E, Walia H, Blumwald E. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnol J*. 2011 Sep;9(7):747-58. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00584.x.
82. Phillips AR, Suttangkakul A, Vierstra RD. The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2008 Mar;178(3):1339-53. doi: 10.1534/genetics.107.086199.
83. Poret M, Chandrasekar B, van der Hoorn RAL, Avicé JC. Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape. *Plant Sci*. 2016 May;246:139-153. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.02.011.ç.
84. Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta*. 2006 Aug;224(3):556-68. doi: 10.1007/s00425-006-0243-y.
85. Prince SJ, Joshi T, Mutava RN, Syed N, Joao Vitor Mdos S, Patil G, Song L, Wang J, Lin L, Chen W, Shannon JG, Valliyodan B, Xu D, Nguyen HT. Comparative analysis of the drought-responsive transcriptome in soybean lines contrasting for canopy wilting. *Plant Sci*. 2015 Nov;240:65-78. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.08.017.
86. Reguera M, Peleg Z, Abdel-Tawab YM, Tumimbang EB, Delatorre CA, Blumwald E. Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. *Plant Physiol*. 2013 Dec;163(4):1609-22. doi: 10.1104/pp.113.227702.
87. Ries L, Purcell L, Carter T, Edwards JT, King CA. Physiological Traits Contributing to Differential Canopy Wilting in Soybean under Drought. *Crop Sci*. 2012. 52. 272. 10.2135/cropsci2011.05.0278.
88. Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald E. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4;104(49):19631-6. doi: 10.1073/pnas.0709453104.

89. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*. 2014 Jan 23;53(2):167-78. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.014.
90. Rossato L, Lainé P, Ourry A. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *J Exp Bot*. 2001 Aug;52(361):1655-63.
91. Roulin A, Auer PL, Libault M, Schlueter J, Farmer A, May G, Stacey G, Doerge RW, Jackson SA. The fate of duplicated genes in a polyploid plant genome. *Plant J*. 2013;73(1):143–53. <https://doi.org/10.1111/tpj.12026>.
92. Sade N, Umnajkitikorn K, Rubio Wilhelmi MDM, Wright M, Wang S, Blumwald E. Delaying chloroplast turnover increases water-deficit stress tolerance through the enhancement of nitrogen assimilation in rice. *J Exp Bot*. 2018 Feb 12;69(4):867-878. doi: 10.1093/jxb/erx247.
93. Schwechheimer C, Schröder PM, Blaby-Haas CE. Plant GATA Factors: Their Biology, Phylogeny, and Phylogenomics. *Annu Rev Plant Biol*. 2022 May 20;73:123-148. doi: 10.1146/annurev-arplant-072221-092913.
94. Sheldrake AR. The production of auxin by dying cells. *J Exp Bot*. 2021 Mar 29;72(7):2288-2300. doi: 10.1093/jxb/erab009.
95. Shen C, Yang Y, Du L, Wang H. Calmodulin-binding transcription activators and perspectives for applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Dec;99(24):10379-85. doi: 10.1007/s00253-015-6966-6.
96. Shin JH, Vaughn JN, Abdel-Haleem H, Chavarro C, Abernathy B, Kim KD, Jackson SA, Li Z. Transcriptomic changes due to water deficit define a general soybean response and accession-specific pathways for drought avoidance. *BMC Plant Biol* (2015) 15:26. doi: 10.1186/s12870-015-0422-8.
97. Slavikova S, Ufaz S, Avin-Wittenberg T, Levanony H, Galili G. An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of *Arabidopsis* seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. *J Exp Bot*. 2008;59(14):4029-43. doi: 10.1093/jxb/ern244.

98. Sloane RJ, Patterson RP, Carter TE. Field drought tolerance of a soybean plant introduction. *Crop Sci.* 1990 30, 118–123. doi: 10.2135/cropsci1990.0011183X003000010027x.
99. Svenning S, Lamark T, Krause K, Johansen T. Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy.* 2011 Sep;7(9):993-1010. doi: 10.4161/auto.7.9.16389.
100. Szostak B, Głowacka A, Klebaniuk R, Kiełtyka-Dadasiewicz A. Mineral Composition of Traditional Non-GMO Soybean Cultivars in relation to Nitrogen Fertilization. *ScientificWorldJournal.* 2020 Jun 22;2020:9374564. doi: 10.1155/2020/9374564.
101. Tardieu F, Simonneau T, Muller B. The Physiological Basis of Drought Tolerance in Crop Plants: A Scenario-Dependent Probabilistic Approach. *Annu Rev Plant Biol.* 2018 Apr 29;69:733-759. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040218.
102. Tegeder M, Masclaux-Daubresse C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytol.* 2018 Jan;217(1):35-53. doi: 10.1111/nph.14876.
103. Turner M, Nizampatnam NR, Baron M, Coppin S, Damodaran S, Adhikari S, Arunachalam SP, Yu O, Subramanian S. Ectopic expression of miR160 results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean. *Plant Physiol.* 2013 Aug;162(4):2042-55. doi: 10.1104/pp.113.220699.
104. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* (2012) 40(15):e115. doi: 10.1093/nar/gks596.
105. USDA, Foreign agricultural service, 2022 World Agricultural Production Report. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>
106. Vanhee C, Zapotoczny G, Masquelier D, Ghislain M, Batoko H. The Arabidopsis multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *Plant Cell.* 2011 Feb;23(2):785-805. doi: 10.1105/tpc.110.081570.

107. Vitha S, Beneš K, Phillips JP, Gartland KMA. (1995). Histochemical GUS Analysis. In *Agrobacterium Protocols*, KMA Gartland and MR Davey, eds (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 185-193.
108. Waadt R, Seller CA, Hsu PK, Takahashi Y, Munemasa S, Schroeder JI. Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Oct;23(10):680-694. doi: 10.1038/s41580-022-00479-6.
109. Wachsman G, Benfey PN. Lateral Root Initiation: The Emergence of New Primordia Following Cell Death. *Curr Biol.* 2020 Feb 3;30(3):R121-R122. doi: 10.1016/j.cub.2019.12.032.
110. Wang S, Blumwald E. Stress-induced chloroplast degradation in Arabidopsis is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell.* 2014 Dec;26(12):4875-88. doi: 10.1105/tpc.114.133116.
111. Wang W, Xu M, Wang G, Galili G. Autophagy: an important biological process that protects plants from stressful environments. *Front Plant Sci* (2017) 7, doi: 10.3389/fpls.2016.02030.
112. Wojciechowska N, Smugarzewska I, Marzec-Schmidt K, Zarzyńska-Nowak A, Bagniewska-Zadworna A. Occurrence of autophagy during pioneer root and stem development in *Populus trichocarpa*. *Planta.* 2019 Dec;250(6):1789-1801. doi: 10.1007/s00425-019-03265-5.
113. Xie Q, Michaeli S, Peled-Zehavi H, Galili G. Chloroplast degradation: one organelle, multiple degradation pathways. *Trends Plant Sci.* 2015 May;20(5):264-265. doi: 10.1016/j.tplants.2015.03.013.
114. Zhang C, Hou Y, Hao Q, Chen H, Chen L, Yuan S, Shan Z, Zhang X, Yang Z, Qiu D, Zhou X, Huang W. Genome-wide survey of the soybean GATA transcription factor gene family and expression analysis under low nitrogen stress. *PLoS One.* 2015 Apr 17;10(4):e0125174. doi: 10.1371/journal.pone.0125174.
115. Zientara-Rytter K, Lukomska J, Moniuszko G, Gwozdecki R, Surowiecki P, Lewandowska M, Liszewska F, Wawrzyńska A, Sirko A. Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors. *Autophagy.* 2011 Oct;7(10):1145-58. doi: 10.4161/auto.7.10.16617.

116. Zhuang X, Jiang L. Chloroplast Degradation: Multiple Routes Into the Vacuole. *Front Plant Sci.* 2019 Mar 26;10:359. doi: 10.3389/fpls.2019.00359.

6. Capítulo 2: Generación de herramientas para edición génica en soja

Los resultados obtenidos en el Capítulo 1 de este trabajo refuerzan la idea de que la ruta de vesiculación cloroplástica en soja participa en la senescencia natural y en la muerte celular programada que ocurre durante el desarrollo (dPCD). A su vez, se mostró que existe una especialización funcional de los genes parálogos *CV1* y *CV2*, que ocurre como consecuencia de la regulación diferencial de la expresión génica de estos genes. *CV2* participa principalmente en los procesos de senescencia natural de soja, mientras que *CV1* estaría involucrado en las respuestas de senescencia inducida por estrés. De acuerdo a este comportamiento diferencial, se puede especular que se podría alterar la senescencia inducida por estrés sin modificar la senescencia natural, por ejemplo, eliminando la función del gen *CV1* mediante la generación de mutantes *knockout* por edición génica

En plantas, la utilización del sistema CRISPR/Cas9 implica la selección y puesta a punto de i) una estrategia de clonado para la expresión de Cas9 y los gRNAs; ii) una metodología para la introducción de estos componentes en las células vegetales; iii) un método de regeneración de las plantas a partir de células transformadas; y iv) una estrategia de selección y genotipado de las plantas para la identificación de las mutaciones inducidas.

En este trabajo se llevaron a cabo una serie de pasos para la optimización del sistema CRISPR/Cas9 en soja con énfasis en la edición de los genes CV.

6.1. Objetivos

1. Generar un protocolo optimizado para la producción y purificación de Cas9 y sgRNAs para evaluar la actividad de las ribonucleoproteínas (RNPs) sobre las secuencias de DNA blanco.
2. Generar y evaluar sgRNAs específicos para introducir mutaciones *knock-out* en *CV1*, *CV2* o *CV1/CV2* simultáneamente.
3. Generar y evaluar sistemas de expresión e introducción de Cas9 y sgRNAs en soja.
4. Obtener plantas con mutaciones *knockout* en *CV1* y/o *CV2*.

6.2. Resultados

Optimización de un sistema de producción y purificación de Cas9 para análisis de actividad *in vitro*.

Con el objetivo de obtener un sistema económico para validar los sgRNAs de forma rutinaria, se optimizó un protocolo para la producción y purificación de la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) de forma casera, y un método para evaluar la actividad específica de las RNPs (Cas9-sgRNAs), sobre distintas secuencias blanco de sgRNAs, entre ellas, los genes CV1 y CV2. El proceso de optimización dió lugar a una publicación (Fleitas et al, 2022), incluida en esta tesis.

7. Artículo publicado



Protocol

A Robust Expression and Purification Method for Production of SpCas9-GFP-MBP Fusion Protein for In Vitro Applications

Andrea Luciana Fleitas ^{1,*}, Mario Señorale ² and Sabina Vidal ^{1,✉}

¹ Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

² Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay; msenorale@gmail.com

* Correspondence: lfleitas@fcien.edu.uy (A.L.F.); svidal@fcien.edu.uy (S.V.)

Abstract: Genome editing using the CRISPR/Cas9 system is one of the trendiest methodologies in the scientific community. Many genome editing approaches require recombinant *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) at some point during their application, for instance, for in vitro validation of single guide RNAs (sgRNAs) or for the DNA-free editing of genes of interest. Hereby, we provide a simple and detailed expression and purification protocol for SpCas9 as a protein fused to GFP and MBP. This protocol improves protein yield and simplifies the purification process by overcoming the frequently occurring obstacles such as plasmid loss, inconsistent protein expression levels, or inadequate protein binding to affinity resins. On average, this protocol yields 10 to 30 mg of purified, active, His6-MBP-SpCas9-NLS-GFP protein. The purity addressed through SDS-PAGE is > 80%.

Keywords: CRISPR/Cas9; expression; purification; immobilized metal affinity chromatography; ion exchange



Citation: Fleitas, A.L.; Señorale, M.; Vidal, S. A Robust Expression and Purification Method for Production of SpCas9-GFP-MBP Fusion Protein for In Vitro Applications. *Methods Protoc.* 2022, 5, 44. <https://doi.org/10.3390/mps5030044>

Academic Editors: Antonia Monteiro and Philip Hublitz

Received: 8 March 2022

Accepted: 23 May 2022

Published: 28 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-CRISPR associated protein 9) system is the most efficient, flexible, and broadly used technology for genome editing (GE). CRISPR/Cas9 based systems involve a powerful and continuously growing number of tools for a variety of applications, such as targeted DNA mutagenesis, transcriptional control of gene expression, nucleic acid dynamics imaging and epigenetic manipulation [1,2], as well as diagnostic assays [3].

While DNA-free methodologies have become popular for GE of animal cells [4,5], in plants, GE is frequently implemented using transgenesis to introduce a gene construct that allows the expression of Cas9 and the single guide RNAs (sgRNA). Stable transformed plants harboring the intended mutation can be subsequently self-pollinated or crossed to segregate the incorporated DNA construct to obtain transgene-free plants [6,7]. However, DNA-free strategies can be used in plants to guarantee the non-incorporation of foreign DNA into the genome. Instead of using DNA constructs, Cas9 can be directly delivered into the cells in the form of a protein or messenger RNA (mRNA), together with the in vitro synthesized sgRNAs [8–14].

Regardless of the method for delivering the editing machinery into the cells, most in vivo applications of CRISPR-based technologies require prior in vitro testing of sgRNA efficiency on target recognition using Cas9-sgRNA ribonucleoprotein (RNP). This is particularly important when working with plants, where editing performance can be highly affected by the transformation and tissue culture efficiencies of the plant species [6,7]. Even though Cas9 can be commercially acquired, the cost of this reagent can still be too high for emerging research groups or researchers working in low-income countries.

Although a number of protocols for *Streptococcus pyogenes* Cas9 expression and purification have been published (Table 1), we provide an improved step by step protocol that

includes a number of modifications made over previously described ones. Most important modifications were performed at the bacterial expression stage but some key tips are also highlighted to prevent common pitfalls during purification.

In this protocol, SpCas9 is expressed as a protein fused to green fluorescent protein (GFP), and maltose binding protein (MBP). The GFP tag allows for the presence of the recombinant protein to be monitored throughout all the steps of the procedure, while MBP acts as a solubility enhancer tag.

While most other published protocols require three steps for the purification of SpCas9 [15–21], our protocol describes a two-step purification procedure that results in large quantities of active, MBP and GFP-fused SpCas9, which is suitable for *in vitro* applications. The entire purification protocol can be carried out within a single day, achieving a good compromise between purity and working time. In addition, our protocol resulted in a significant improvement of protein yield (~30 mg/L of bacterial culture), in comparison to yields reported for other previously described protocols, listed in Table 1 (~1.2 mg–~6 mg/L of bacterial culture) [15,22–24].

The protocol also describes the additional steps required for removal of MBP and the purification of SpCas9–GFP for *in vivo* GE applications. The GFP labeling of SpCas9 allows for the visible confirmation of the delivery of RNPs and the enrichment of the target cells after transfection of the eukaryotic cells, without compromising the activity of SpCas9 [18,25–28].

Table 1. Cas9 expression and purification protocols.

| Plasmid | Reported Yield/L of Bacterial Culture | Reference |
|---|---------------------------------------|-----------|
| pMJ915 (MBP – Cas9) | 1.77 mg | [15] |
| pET-NLS Cas9 – 6xHis | 1.2 mg | [22] |
| pET-28b-Cas9 – His (Cas9 – His) | 8.38 mg (best condition reported) | [23] |
| pET15 (Cas9 – 6xHis) | 6 mg | [24] |
| His – MBP – Cas9 | | |
| Cas9 D10A, H840A and D10A/H840A point mutants | NR * | [16,17] |
| PMJ922 | | |
| (His – MBP – TEV – Cas9 NLS – GFP) | NR * | [18] |
| His – MBP – Cas9 | | |
| Cas9 D10A, H840A and D10A/H840A point mutants | NR * | [19,20] |
| D10A / H840A dCas9 | NR * | [21] |
| pET-Cas9 NLS – 6xHis | NR * | [29] |
| pET-28b-Cas9 – His | NR * | [30] |
| pET-28b-Cas9 – His | NR * | [31] |

* NR: not reported.

To our knowledge, this is the first report of a detailed Cas9 purification protocol that includes troubleshooting for each stage of the procedure. Moreover, alternative procedures are included in case not all of the listed equipment is available in the lab (Section 5).

2. Experimental Design

The protein was expressed from plasmid pMJ922 [18] obtained from Addgene (Figure 1A). This plasmid allows the expression of SpCas9 fused in-frame with a C-terminal hemagglutinin (HA) epitope tag, a bipartite nuclear localization signal (NLS) sequence, a green fluorescent protein (GFP) polypeptide, and an additional monopartite NLS at the very C-terminus (SpCas9 NLS – GFP). SpCas9 NLS – GFP is expressed as a fusion protein with an N-terminal hexahistidine-maltose binding protein (His6 – MBP) affinity tag (Figure 1) that can be removed by cleavage with Tobacco etch virus protease (TEV-P) during purification, depending on the desired application. The time needed to complete each stage is summarized in Table 2.

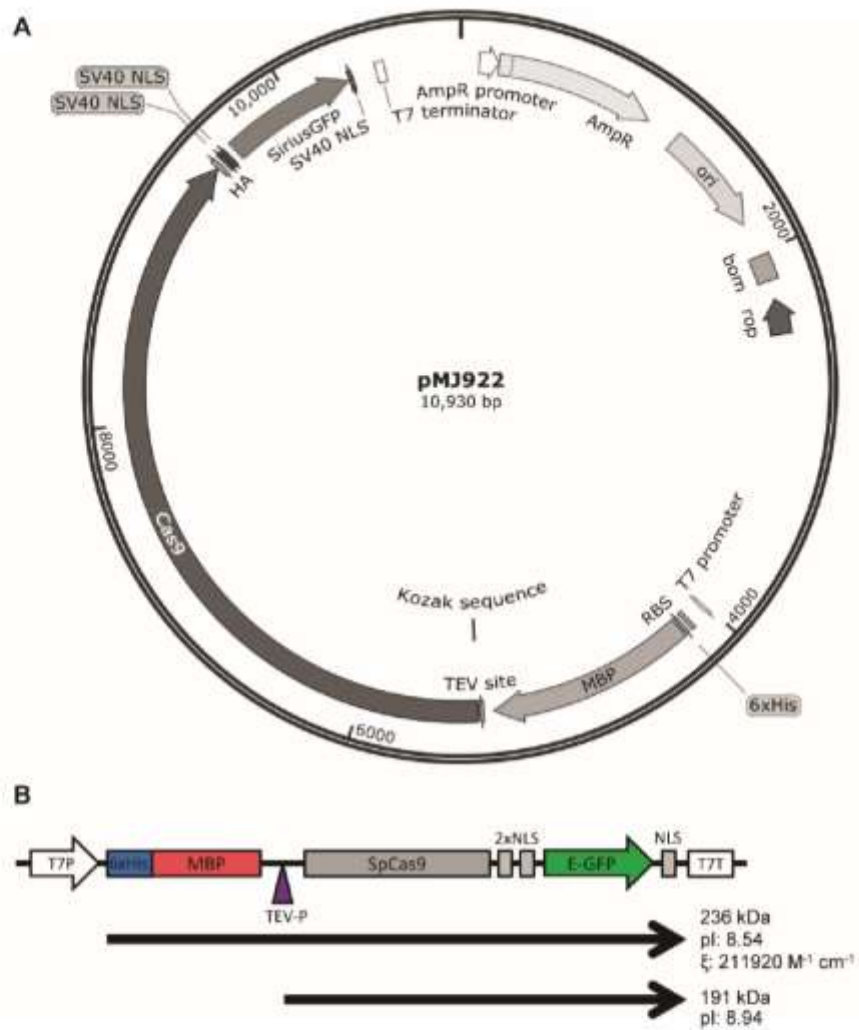


Figure 1. (A) PMJ922 map from Addgene. (B) 6xHis – MBP – SpCas9 NLS – GFP transcriptional unit. 6xHis – MBP can be removed by cleavage with TEV protease. Physicochemical properties for chimeric proteins SpCas9 – GFP – MBP and SpCas9 – GFP are indicated to the right.

Table 2. Experimental design.

| Activity | Step | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 4 | Day 5 | Day 6 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Bacterial transformation | 1 | ON | | | | | |
| Glycerol preparation | 1 | | 8 h | | | | |
| Preparation of starting plate | 2 | | | ON | | | |
| Bacterial growth | 3–5 | | | | 3–4 h | | |
| Induction | 5 | | | | ON | | |
| Harvest | 6–7 | | | | | 1 h | |
| Lysis and clarification | 8–12 | | | | | | 2.5 h |
| IMAC | 13 | | | | | | 1.5 h |
| Buffer exchange | 14 | | | | | | 30 min |
| IEX | 16 | | | | | | 1.5 h |
| Buffer exchange | 17 | | | | | | 30 min |
| SDS-PAGE | 19 | | | | | | 1.5 h |
| Storage | 20–21 | | | | | | 30 min |

2.1. Materials

1. pMJ922 (Addgene, Cambridge, MA, USA; plasmid no. 78312).
2. Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; Cat. no.: C602003).
3. TRIS (Duchefa Biochemie; Haarlem, The Netherlands; Cat. no.: T1501).
4. HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Cat. no.: H-3375).
5. Potassium chloride (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA; Cat. no.: P3911).
6. Magnesium chloride hexahydrate (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA; Cat. no.: M2670).
7. Sodium chloride (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA; Cat. no.: S7653).
8. Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA; Cat. no.: C4706).
9. DTT (Duchefa Biochemie; Haarlem, The Netherlands; Cat. no.: D1309).
10. Imidazole (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA; Cat. no.: I-2399).
11. Glycerol (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA; Cat. no.: G5516).
12. Benzonase (Pierce, Waltham, MA, USA; Cat. no. 88701).
13. Protease inhibitor tablets (Roche, Basel, Switzerland; Cat. no. 05892970001).
14. HiTrap IMAC FF (GE Healthcare; Chicago, IL, USA; Cat. no. 17092104).
15. PD-10 desalting columns (GE Healthcare; Cat. no. 17-0851-01).
16. HiTrap SP HP (GE Healthcare; Chicago, IL, USA; Cat. no. GE29-0513-24).
17. Polycarbonate bottles (Beckman, Brea, CA, USA; Cat. no. 355605).

2.2. Equipment

- Refrigerated orbital shaker (Labotech, Midrand, South Africa; Model: ZWY-211C).
- Magnetic stirrer (Thermolyne, Waltham, MA, USA).
- Sonicator (Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA. Model: Pulse 150).
- Beckman J2HC refrigerated centrifuge (Beckman, Brea, CA, USA; Cat. no.: 8043-30-1105).
- Beckman JA-10 rotor (Beckman, Brea, CA, USA; Cat. no.: 369687).
- Beckman JA-20 rotor (Beckman, Brea, CA, USA; Cat. no.: 334831).
- ÄKTA FPLC system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden; Cat. no.: 29-0598-78 AB).

3. Procedure

3.1. Protein Expression

1. Transform pMJ922 into competent *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Isolate single colonies and cultivate them for 8 h in liquid LB containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol. Prepare stocks using 25% glycerol final concentration.

▲ CRITICAL STEP: overgrowing bacterial cells may lead to plasmid loss. It is recommendable to check plasmid presence at this step either through PCR or miniprep.
2. Prepare starting plates for protein expression. Spread glycerol stock onto a solid LB plate containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol. Completely streak the plate to cover the entire plate with bacteria. Incubate at 37 °C overnight (Figure 2A).

▲ CRITICAL STEP: this plate is used in replacement of an overnight grown culture. Prepare two plates for this purpose.
3. Using a sterile spatula, scrape all the bacteria from a plate and resuspend the cells in 5 mL LB media. Add this suspension to a 2 L Erlenmeyer containing 500 mL TB media (24 g/L yeast extract, 20 g/L tryptone, 4 mL/L glycerol, 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄) supplemented with 200 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol. Incubate at 37 °C and 200 rpm until absorbance at 600 nm reach 0.6. Prepare two Erlenmeyers for this purpose.
4. Cool down the cultures at 4 °C for at least 30 min to arrest growth.

5. Supplement the cultures with ampicillin once again (to reach a final concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$) and subsequently induce protein expression by adding 200 μM isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Cultivate for 16 h at 18 $^{\circ}\text{C}$ and 180 rpm.
 - ▲ CRITICAL STEP: ampicillin reinforcement ensures that selection of the plasmid is maintained during overnight induction.
6. Harvest the cells in four 500 mL polycarbonate bottles (Beckman, Cat. no. 355605) by centrifugation at $3000 \times g$ for 20 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. Resuspend the cell pellet in 100 mL of the supernatant and transfer to two 50 mL Falcon tubes. Centrifuge at $3000 \times g$ for 20 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ and weight the pellet.
 - ▲ CRITICAL STEP: the pellet should be greenish due to the GFP expression (Figure 2B).
7. Ⓜ PAUSE STEP: pellets can be stored at -80°C for several months until use.

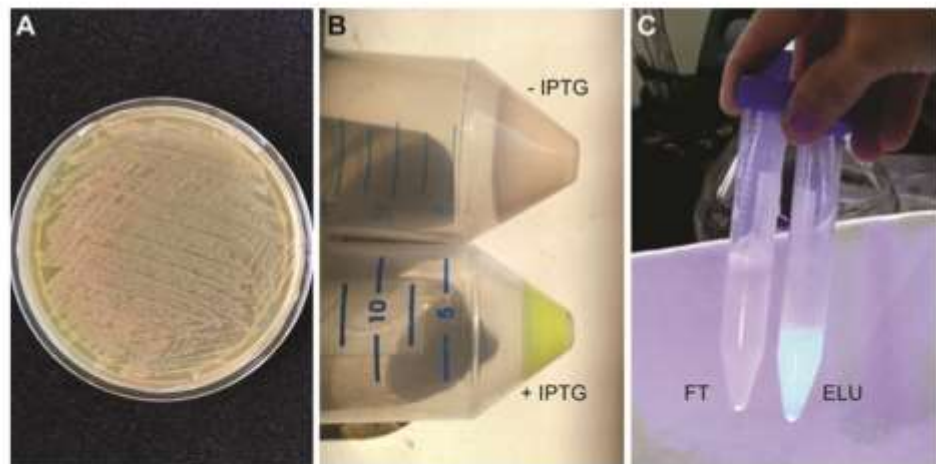


Figure 2. (A) Starting bacterial plate. (B) Greenish pellet obtained after induction with IPTG. (C) GFP fluorescence under UV light of different fractions during IMAC. FT: IMAC flow through; ELU: IMAC elution.

3.2. Protein Purification

3.2.1. Bacterial Lysis

1. Resuspend 3–6 g of cell pellet in IMAC buffer A (50 mM TRIS pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) in a 5:1 buffer:pellet ratio. Perform an initial lysis step by three cycles of freezing/thawing the pellet at -80°C . Transfer the suspension to a small beaker and add lysozyme to a final concentration of 0.1 mg/mL, 1 mM DTT final concentration, additional MgCl_2 , 1:500 v/v from 1 M stock solution, a protease inhibitor tablet (Roche, Cat. no. 05892970001) and 1 μL of benzonase (25 kU/ μL , Pierce, Cat. 88701).
 - ▲ CRITICAL STEP: using benzonase instead of DNase greatly simplifies further purification steps. Benzonase digests all forms of nucleic acids, which can affect purity during IMAC and binding to the ion exchange resin if left undigested. Contamination with nucleic acids from *E. coli* can be problematic for Cas9 purification because these molecules can interfere with the binding capacity of Cas9 to the IEX resin due to PI alteration. This problem can be addressed by using RNase in addition to DNase or, alternatively, benzonase, which exhibits both DNase and RNase activity.
2. Incubate for 30 min on ice under very gentle stirring to avoid foam formation.
3. Perform 4 cycles of sonication using 40% amplitude pulses for 3 min, with pauses of 2 min in between them.
4. Clarify the suspension by centrifugation for 15 min at $16,000 \times g$ at 4 $^{\circ}\text{C}$. Transfer the supernatant to a new tube and centrifuge again for 45 min at $16,600 \times g$ and 4 $^{\circ}\text{C}$.

5. **OPTIONAL STEP:** filtrate through a 0.45 μm filter if the lysate is not totally transparent.

3.2.2. IMAC

6. Load the soluble fraction into a 5 mL IMAC HiTrap FastFlow column (GE, Cat. 17092104), previously equilibrated with 10 column volumes (CV) of IMAC buffer A. Wash the column with at least 25 CV of IMAC buffer A. Elute resin-bound proteins with IMAC buffer B (50 mM TRIS pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 400 mM imidazole) in 0.5 mL fractions.

▲ CRITICAL STEP: extensively wash unbound protein. More than 25 CV may be needed in some cases. Measure the absorbance of IMAC buffer A and wash until this value is reached again.

3.2.3. Buffer Exchange in PD-10

7. Pool the protein containing fractions and perform buffer exchange in PD-10 column (GE, Cat. 17-0851-01) following the manufacturer's instructions. Use ion exchange (IEX) buffer A (50 mM TRIS pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) for equilibration. After elution, add DTT to 1 mM final concentration. For *in vitro* applications, continue in Section 3.2.4.
8. **OPTIONAL STEP:** For *in vivo* applications, it is recommended to remove the 6xHis – MBP tag by cleavage with TEV-P (see Section 3.2.7).

3.2.4. IEX

9. Load the protein into the cation exchange SpHp HighTrap column (GE, Cat. GE29-0513-24) previously equilibrated with IEX buffer A. Wash the column with at least 25 CV of IEX buffer A. Elute the protein with a linear gradient of 0.1–1 M NaCl in 20 CV, collecting in fractions of 0.5 mL.
- OPTIONAL STEP:** This step can be performed using a peristaltic pump, in which case elution is performed in a single step with IEX buffer B (50 mM TRIS pH 7.5, 1 M NaCl, 5 mM MgCl₂). The purity obtained is not as good compared to the gradient elution, but the protein can still be used for *in vitro* cleavage assays.

3.2.5. Buffer Exchange in PD-10

10. Pool the protein containing fractions and perform buffer exchange in a PD-10 column equilibrated in storage buffer (30 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ and 1 mM TCEP).
11. **OPTIONAL STEP** : If greater purity is needed, use a Superdex 200 16/600 size exclusion column (GE Healthcare), equilibrated in storage buffer for the final polishing step (Figure 3).

3.2.6. SDS-PAGE

12. Check the purity of the purified protein by SDS-PAGE in 10% acrylamide-bisacrylamide (29:1) gel (Figure 3).

3.2.7. Removal of His – MBP Tag for In Vivo Applications (Optional Step 15, Expanded)

If free SpCas9 – GFP is needed, buffer exchange with a desalting column can be substituted by dialysis against IEX buffer A in the presence of TEV-P. Collect the protein eluted from IMAC (Section 3.2.2) and add DTT to 1 mM final concentration, EDTA to 1 mM final concentration, and 1 mg of TEV-P for every mg of protein.

Place the protein solution in dialysis tubing with a cutoff >12 kDa. Perform dialysis overnight at 4 °C against buffer IEX A. Place the dialysis tubing inside a 500 mL graduated cylinder with constant stirring for this purpose.

To separate free SpCas9 – GFP from His – MBP, perform a second IMAC (IMAC2) using the same conditions as the first IMAC (Section 3.2.2). His – MBP and SpCas9 – GFP bound to MBP will be retained in the IMAC column, while free SpCas9 – GFP will be present in the flow through (Figure S2).

Buffer exchange SpCas9 – GFP obtained from this step as described in Section 3.2.3 and proceed with Section 3.2.4.

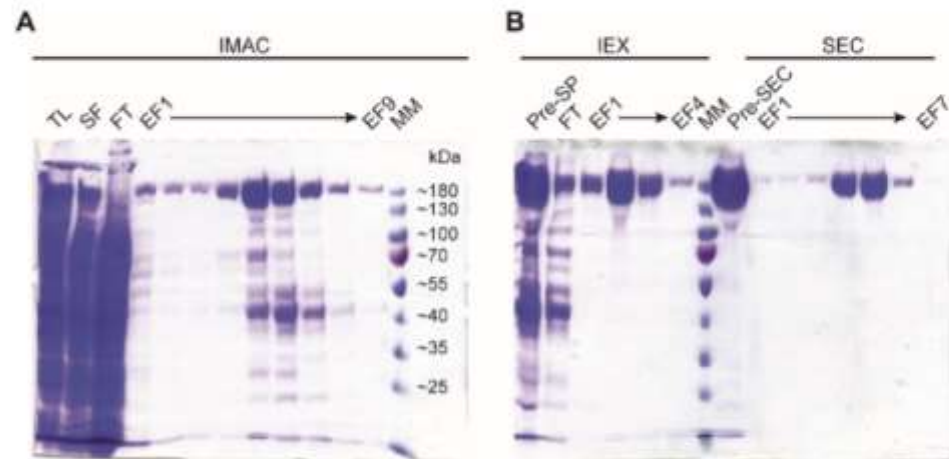


Figure 3. SDS-PAGE run on 10% acrylamide-bisacrylamide gel. (A) IMAC protein samples. (B) IEX and SEC protein samples. TL: total lysate; SF: soluble fraction; FT: flow through; EF: elution fraction; Pre-SP: pre SPHP high trap column; Pre-SEC: pre size exclusion; MM: molecular weight marker.

3.2.8. Protein Storage

13. Quantify the protein concentration using theoretical $\epsilon_{280} = 211,920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
14. Store the protein at a final concentration > 1 mg/mL (usually the protein concentration is higher than 1 mg/mL after buffer exchange). Prepare single use aliquots and flash freeze in liquid nitrogen. Store at -80°C . The protein remains active for over a year.

3.3. In Vitro Nuclease Activity Assay

1. Prepare 50 μL of reaction mixture in 1X Cas9 buffer (0.2 mM HEPES pH 7.5, 1.5 mM KCl, 0.1 mM MgCl_2 , 10 μM EDTA, 50 μM DTT freshly added) as indicated in Table 3.
2. Allow the reaction to equilibrate for 15 min at room temperature. Add 300 ng of the PCR product, briefly vortex and spin. Incubate at 37°C for 2 h.
3. Add 1 μL of 20 mg/mL proteinase K and incubate for 10 min at 37°C . Analyze in agarose gel. The agarose percentage should be according to the expected DNA fragment sizes after cleavage. An example of a typical activity assay is shown in Figure 4.

Table 3. Nuclease activity reaction.

| | Volume (μL) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| H_2O DEPC | To 50 μL |
| Buffer 10X Cas9 + DTT | 5 μL |
| His6 – MBP – SpCas9 NLS – GFP | X μL (4 μg) |
| SgRNA | X μL (1120 ng) |

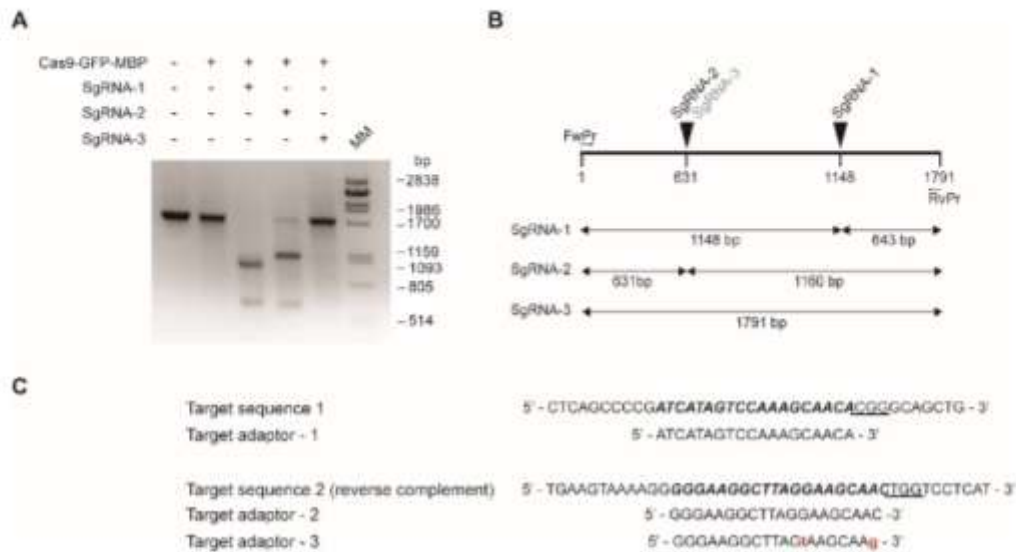


Figure 4. In vitro cleavage assay. (A) Separation of cleaved DNA fragments by electrophoresis in 1% agarose gel. A 1791 bp DNA fragment corresponding to Glyma.06G072000 gene was PCR amplified from soybean genomic DNA using FwPr and RvPr primers. Two specific sgRNAs (sgRNA-1 and sgRNA-2) were designed to target different regions of the gene. An additional sgRNA (sgRNA-3), containing two mismatches with sgRNA-2, was designed to assess RNP specificity. The genomic sequence, sgRNA target sequences and primer sequences are listed in Figure S1, Supplementary Materials. The target DNA sequence was incubated with SpCas9 – GFP – MBP in the presence (+) or absence (–) of sgRNAs. DNA cleavage resulted in sharp bands. The size difference between large fragments slightly deviates from what is expected, which could be explained by electrophoretic artifact. A weak band corresponding to the uncleaved PCR product can be observed in the gel when sgRNA2 was used for target recognition. MM: λ DNA digested with PstI restriction enzyme. (B) Schematic representation of the target genomic sequence, the position of the sgRNAs target sequences and the expected sizes of the DNA fragments after cleavage. (C) Target sequences and sgRNA spacer sequences (target adaptors) are shown to the right. PAM sequences are underlined, and mismatches are in red.

4. Expected Results

On average, this protocol yields 10 to 30 mg of purified, active, His6 – MBP – SpCas9 NLS – GFP protein (~10 mL at 1–3 mg/mL). The purity addressed through SDS-PAGE is >80%.

5. Protocol Alternatives and Troubleshooting

Protocol alternatives can be found in Table 4 and troubleshooting in Table 5.

Table 4. Protocol alternatives.

| Step | Suggested Procedure | Alternative |
|------------|--|--|
| 3.2.2 IMAC | IMAC HiTrap FastFlow column (GE, Cat. no.: 17092104) connected to ÄKTA FPLC system (GE, Cat. no.: 29-0598-78 AB) | <p>A. Perform IMAC with the column connected to a peristaltic pump. Follow absorbance at 280 nm using a spectrophotometer. Equilibrate the IMAC column with 10 CV on IMAC buffer A and measure the buffer absorbance before loading your protein sample. Make sure that this value is reached again after extensively washing bound protein.</p> <p>B. Perform batch incubation with IMAC resin. Follow the absorbance at 280 nm using a spectrophotometer. Equilibrate the resin in IMAC buffer A and measure the buffer absorbance before loading your protein sample. Make sure that this value is reached again after extensively washing bound protein.</p> |

Table 4. Cont.

| Step | Suggested Procedure | Alternative |
|-----------------------|--|---|
| 3.2.3 Buffer exchange | Perform buffer exchange in PD-10 column (GE, Cat. 17-0851-01) into IEX buffer A. | A. Buffer exchange the protein using centrifugal filter units with a cutoff >50 kDa and perform several dilution/concentration steps. Use IEX buffer A as the diluting solution. |
| 3.2.4 IEX | Cation exchange SpHp HighTrap column (GE, Cat. GE29-0513-24) connected to ÄKTA FPLC system (GE, Cat. no.: 29-0598-78 AB) | A. Perform IEX with the column connected to a peristaltic pump. Follow the absorbance at 280 nm using a spectrophotometer. Equilibrate the IMAC column with 10 CV on IEX buffer A and measure the buffer absorbance before loading your protein sample. Make sure that this value is reached again after extensively washing bound protein. Perform elution in a single step with 1 M NaCl concentration or in several steps with increasing NaCl concentrations. |
| 3.2.5 Buffer exchange | Perform buffer exchange in the PD-10 column (GE, Cat. 17-0851-01) into storage buffer. | A. Buffer exchange the protein using centrifugal filter units with a cutoff >50 kDa and perform several dilution/concentration steps. Use storage buffer as the diluting solution. B. Use a Superdex 200 16/600 size exclusion column (GE Healthcare), equilibrated in storage buffer for the final polishing step. |

Table 5. Troubleshooting.

| Problem | Possible Explanation | Solution |
|--|---|---|
| No protein expression | Plasmid loss | Retransform BL21 Rosetta or use another aliquot from your bacterial stock. Check plasmid presence in your bacterial stock. |
| High protein contamination during IMAC | Incomplete wash of nonspecific proteins | Do not elute protein until buffer absorbance from the washing fraction reaches the starting value. Try performing a washing step with IMAC buffer A containing 5 mM imidazole. This can lead to some Cas9 washing as well. |
| No protein binding to IEX column | Nucleic acid contamination. | Treat the protein fraction with benzonase. |

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/mps5030044/s1>, Figure S1: Sequence information for RNP activity assays; Figure S2: MBP removal from MBP-SpCas9-GFP.

Author Contributions: Conceptualization, A.L.F. and S.V.; methodology, A.L.F. and M.S.; investigation, A.L.F. and M.S.; resources, A.L.F. and S.V.; writing—original draft preparation, A.L.F.; writing—review and editing, S.V.; project administration and funding acquisition, A.L.F. and S.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Montevideo, Uruguay), Fondo María Viñas FMV_3_2018_1_148011 and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC)-Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), Grupo 1492.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Wright, A.V.; Nuñez, J.K.; Doudna, J.A. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell* **2016**, *164*, 29–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, C.; Brant, E.; Budak, H.; Zhang, B. CRISPR/Cas: A Nobel Prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2021**, *22*, 253–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tang, Y.; Gao, L.; Feng, W.; Guo, C.; Yang, Q.; Li, F.; Le, X.C. The CRISPR-Cas toolbox for analytical and diagnostic assay development. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 11844–11869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Richardson, C.D.; Ray, G.J.; DeWitt, M.A.; Curie, G.L.; Corn, J.E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* 2016, 34, 339–344. [[CrossRef](#)]
5. Huang, T.P.; Newby, G.A.; Liu, D.R. Precision genome editing using cytosine and adenine base editors in mammalian cells. *Nat. Protoc.* 2021, 16, 1089–1128. [[CrossRef](#)]
6. Atkins, P.A.; Voytas, D.F. Overcoming bottlenecks in plant gene editing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2020, 54, 79–84. [[CrossRef](#)]
7. Banakar, R.; Schubert, M.; Kurgan, G.; Rai, K.M.; Beaudoin, S.F.; Collingwood, M.A.; Vakulskas, C.A.; Wang, K.; Zhang, F. Efficiency, Specificity and Temperature Sensitivity of Cas9 and Cas12a RNPs for DNA-free Genome Editing in Plants. *Front. Genome Ed.* 2022, 3, 760820. [[CrossRef](#)]
8. Woo, J.W.; Kim, J.; Kwon, S.I.; Corvalán, C.; Cho, S.W.; Kim, H.; Kim, S.-G.; Kim, S.-T.; Choe, S.; Kim, J.-S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 2015, 33, 1162–1164. [[CrossRef](#)]
9. Malnoy, M.; Viola, R.; Jung, M.-H.; Koo, O.-J.; Kim, S.; Kim, J.-S.; Velasco, R.; Kanchiswamy, C.N. DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 1904. [[CrossRef](#)]
10. Subburaj, S.; Chung, S.J.; Lee, C.; Ryu, S.-M.; Kim, D.H.; Kim, J.-S.; Bae, S.; Lee, G.-J. Site-directed mutagenesis in *Petunia × hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Rep.* 2016, 35, 1535–1544. [[CrossRef](#)]
11. Liang, Z.; Chen, K.; Li, T.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhao, Q.; Liu, J.; Zhang, H.; Liu, C.; Ran, Y.; et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 2017, 8, 14261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhang, Y.; Liang, Z.; Zong, Y.; Wang, Y.; Liu, J.; Chen, K.; Qiu, J.-L.; Gao, C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.* 2016, 7, 12617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Andersson, M.; Turesson, H.; Olsson, N.; Fält, A.-S.; Ohlsson, P.; Gonzalez, M.N.; Samuelsson, M.; Hofvander, P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol. Plant.* 2018, 164, 378–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Metje-Sprink, J.; Menz, J.; Modrzejewski, D.; Sprink, T. DNA-Free Genome Editing: Past, Present and Future. *Front. Plant Sci.* 2019, 9, 1957. [[CrossRef](#)]
15. Dilworth, D.; Harding, R.; Ravichandran, M.; Baryshte-Lovejoy, D. Purification of Recombinant Cas9. Available online: <https://openlabnotebooks.org/purification-of-recombinant-cas9/> (accessed on 2 February 2022).
16. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012, 337, 816–821. [[CrossRef](#)]
17. Jinek, M.; Jiang, F.; Taylor, D.W.; Sternberg, S.H.; Kaya, E.; Ma, E.; Anders, C.; Hauer, M.; Zhou, K.; Lin, S.; et al. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science* 2014, 343, 1247997. [[CrossRef](#)]
18. Burger, A.; Lindsay, H.; Felker, A.; Hess, C.; Anders, C.; Chiavacci, E.; Zaugg, J.; Weber, L.M.; Catena, R.; Jinek, M.; et al. Maximizing mutagenesis with solubilized CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Development* 2016, 143, 2025–2037. [[CrossRef](#)]
19. Anders, C.; Jinek, M. *In Vitro* Enzymology of Cas9. *Methods Enzymol.* 2014, 546, 1–20. [[CrossRef](#)]
20. Anders, C.; Niewoehner, O.; Duerst, A.; Jinek, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 2014, 513, 569–573. [[CrossRef](#)]
21. Sternberg, S.H.; Redding, S.; Jinek, M.; Greene, E.C.; Doudna, J.A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 2014, 507, 62–67. [[CrossRef](#)]
22. Rajagopalan, N.; Kagale, S.; Bhowmik, P.; Song, H. A Two-Step Method for Obtaining Highly Pure Cas9 Nuclease for Genome Editing, Biophysical, and Structural Studies. *Methods Protoc.* 2018, 1, 17. [[CrossRef](#)]
23. Carmignotto, G.P.; Azzoni, A.R. On the expression of recombinant Cas9 protein in *E. coli* BL21(DE3) and BL21(DE3) Rosetta strains. *J. Biotechnol.* 2019, 306, 62–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. D’Astolfo, D.S.; Pagliero, R.J.; Pras, A.; Karthaus, W.R.; Clevers, H.; Prasad, V.; Lebbink, R.J.; Rehmann, H.; Geijsen, N. Efficient Intracellular Delivery of Native Proteins. *Cell* 2015, 161, 674–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Park, J.; Yoon, J.; Kwon, D.; Han, M.-J.; Choi, S.; Park, S.; Lee, J.; Lee, K.; Lee, J.; Lee, S.; et al. Enhanced genome editing efficiency of CRISPR PLUS: Cas9 chimeric fusion proteins. *Sci. Rep.* 2021, 11, 16199. [[CrossRef](#)]
26. Chaverra-Rodriguez, D.; Macias, V.M.; Hughes, G.L.; Pujhari, S.; Suzuki, Y.; Peterson, D.R.; Kim, D.; McKeand, S.; Rasgon, J.L. Targeted delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein into arthropod ovaries for heritable germline gene editing. *Nat. Commun.* 2018, 9, 3008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Yamagishi, A.; Matsumoto, D.; Kato, Y.; Honda, Y.; Morikawa, M.; Iwata, F.; Kobayashi, T.; Nakamura, C. Direct Delivery of Cas9-sgRNA Ribonucleoproteins into Cells Using a Nanoneedle Array. *Appl. Sci.* 2019, 9, 965. [[CrossRef](#)]
28. Lin, S.; Staahl, B.T.; Alla, R.K.; Doudna, J.A. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife* 2014, 3, e04766. [[CrossRef](#)]
29. Yan, Q.-L.; Kong, H.-T.; Xia, K.; Zhang, Y.; Aladlbahi, A.; Shi, J.-Y.; Wang, L.-H.; Fan, C.-H.; Zhao, Y.; Zhu, Y. Expression and radiolabeling of Cas9 protein. *Nucl. Sci. Tech.* 2017, 28, 11. [[CrossRef](#)]
30. Liu, J.; Gaj, T.; Yang, Y.; Wang, N.; Shui, S.; Kim, S.; Kanchiswamy, C.N.; Kim, J.-S.; Barbas, C.F., 3rd. Efficient delivery of nuclease proteins for genome editing in human stem cells and primary cells. *Nat. Protoc.* 2015, 10, 1842–1859. [[CrossRef](#)]
31. Gagnon, J.A.; Valen, E.; Thyme, S.B.; Huang, P.; Akhmetova, L.; Pauli, A.; Montague, T.G.; Zimmerman, S.; Richter, C.; Schier, A.F. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS ONE* 2014, 9, e98186, Erratum in *PLoS ONE* 2014, 9, e106396. [[CrossRef](#)]

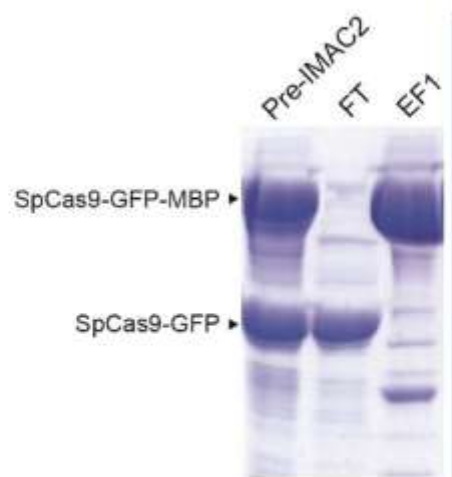


Figure S2. MBP removal from MBP-*SpCas9-GFP*.

Eluted MBP-*SpCas9-GFP* from IMAC was dialyzed overnight at 4°C with constant stirring against buffer A IEX using a dialysis tubing with a cutoff > 12 kDa. One 1mg TEV-P was used for every mg of protein, in the presence of 1 mM DTT and 1 mM EDTA. A sample of the protein mixture was loaded in the gel, showing partial digestion (pre-IMAC2). A second IMAC (IMAC2), performed under the same conditions as IMAC1 was done to recover *SpCas9-GFP*, which can be observed in the flow through (FT). MBP-*SpCas9-GFP* was retained in the IMAC column and eluted with imidazole (EF1: eluted fraction 1). SDS-PAGE was run in an 8 % acrylamide-bisacrylamide gel.

8. Herramientas para edición génica en soja

8.1. Generación y evaluación de sistemas de expresión e introducción de Cas9 y sgRNAs en soja y edición de los genes CV1, CV2 y CVI/CV2.

Con el fin de promover la edición de ambos *loci* codificantes para proteínas CV de soja, se diseñaron tres sgRNAs. Uno de ellos, tiene por blanco ambos genes CV (sgRNA-1), mientras que los otros dos tienen por blanco a cada uno de los genes individualmente (sgRNA-2 y sgRNA-3) (Figura 5.A).

Para comprobar la eficacia de los sgRNAs para generar cortes en las secuencias blanco, se realizaron ensayos de corte *in vitro*, utilizando la proteína SpCas9-GFP-MBP y los sgRNAs obtenidos mediante transcripción *in vitro* (Fleitas et al., 2022). Los sgRNAs fueron ensamblados con SpCas9-GFP-MBP y las RNPs resultantes fueron utilizadas para analizar la capacidad de cortar específicamente CV1 o CV2. Para ello, se utilizaron como molde los productos de PCR amplificados a partir de DNA genómico del cultivar Jack, genotipo de soja empleado para la transformación mediante biolística.

Los sgRNAs diseñados fueron efectivos para promover el corte por la proteína SpCas9-GFP-MBP de sus secuencias blanco, al mismo tiempo que los sgRNAs específicos para cada gen no mostraron reacción cruzada para el parálogo (Figura 5.B).

El sgRNA1 permitió el corte de tanto CV1 como CV2, mientras que los sgRNA2 o sgRNA3 habilitaron el corte en secuencias específicas presentes en CV1 o CV2, respectivamente. Estos resultados eran esperados dada la presencia de imperfecciones en el apareamiento de bases entre los sgRNAs y la secuencia presente en el gen no blanco (Figura 5.C). En ese contexto, los tres sgRNAs fueron seleccionados para la edición génica *in vivo* de los genes CV1 y CV2 en soja.

8.2. Estrategias de introducción y expresión del sistema CRISPR/Cas9 en soja.

Existen una serie de vectores optimizados para la expresión *in vivo* de Cas9 y sgRNAs. En la mayoría de los casos se utilizan vectores de DNA que son introducidos a las células vegetales mediante transgénesis (Bortesi y Fisher, 2015). Para ello, el gen Cas9 debe estar optimizado de acuerdo al uso de codones de la especie a editar y modificado para contener una señal de localización nuclear. Generalmente el gen Cas9 se clona bajo la regulación de un promotor para la RNA polimerasa II como el de ubiquitina. Por el contrario,

Herramientas para edición génica

para expresar el sgRNA *in vivo*, generalmente se utilizan promotores específicos de la RNA polimerasa III, como U6 o U3 de *Arabidopsis* o arroz.

Habiendo observado la eficacia y especificidad en el sistema *in vitro*, los sgRNAs fueron incorporados en construcciones para la transformación de soja. Inicialmente se decidió emplear dos estrategias: por un lado el sistema pMR (modificado de Fauser et al., 2014, cedido por Hiromi Tajima, UC Davis). En este sistema, cada uno de los sgRNAs fue clonado en un vector de entrada para el sistema Gateway, y ensamblado en la construcción final en el vector pMR285, mediante LR múltiple (Figura 6.A). Por otro lado, se decidió generar un sistema de vectores que contuvieran secuencias optimizadas para la expresión de la Cas9 y de los sgRNAs en leguminosas (pLuCas). En este sistema, cada uno de los sgRNAs se clonó en un vector pGEM o pUC19 conteniendo el scaffold del sgRNA bajo el control de un promotor U6.6 o U6.7 de *Medicago truncatula* y luego ensamblados en un vector final pZH2B-GmCas9, utilizando los extremos compatibles de las enzimas de restricción *Ascl* y *MluI* (Figura 6.B). Se decidió utilizar estos promotores ya que están bien caracterizados en la literatura y han sido utilizados para llevar adelante otras aproximaciones biotecnológicas (como silenciamiento), aventajando a los de soja al momento en que se generaron estas construcciones (Kim y Nam, 2013; Kim et al., 2013).

Dada la presencia de cassettes de selección basados en la resistencia a higromicina, estas construcciones fueron utilizadas para transformar embriones somáticos de soja mediante biolística. La higromicina es un agente de selección adecuado para la transformación de soja mediante biolística, ya que permite seleccionar a nivel de embriones somáticos (Gallino et al., 2018b).

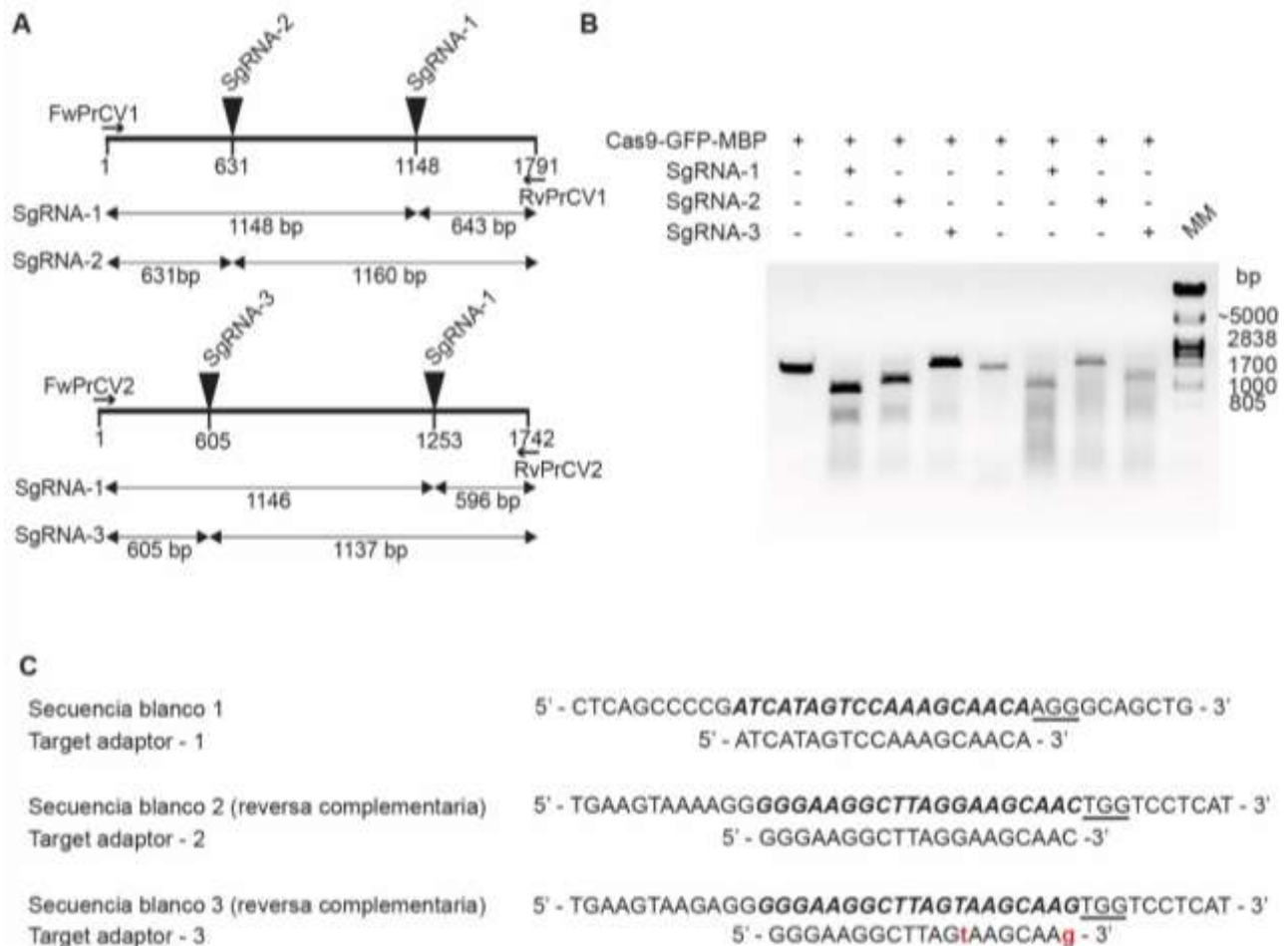
Luego de la transformación, los embriones somáticos resistentes a higromicina, en etapa de diferenciación, fueron evaluados para la presencia del marcador de resistencia, por amplificación por PCR a partir de DNA genómico

Se obtuvieron varias líneas resistentes a higromicina para ambas construcciones que fueron positivas para la presencia de la construcción (Figura 7.A). Los embriones somáticos positivos, fueron diferenciados y germinados. Se analizó la presencia de mutaciones en las plantas regeneradas mediante análisis de longitud de fragmentos de alta resolución (HRFA) (Figura 7.B). En aquellos casos en que los resultados no fueron concluyentes, los productos de PCR fueron secuenciados por sanger (Figura 7.C). Se analizaron más de 120 plantas pero en ningún caso se encontró presencia de mutaciones en los *loci* de interés.

Ante este resultado se decidió adoptar una serie de medidas alternativas para lograr concretar la edición de los genes *CV* de soja utilizando un método de transformación diferente a la biolística. Se optó por la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para evitar el posible fraccionamiento del DNA

Herramientas para edición génica

de la construcción génica durante el proceso de transformación. En ese contexto, se utilizó un vector binario de transformación conteniendo un cassette de selección basado en la resistencia a glufosinato de amonio (Michno et al., 2015). Este compuesto es más adecuado que la higromicina, para la selección de callos transformados (Li et al., 2017). Se generó una nueva construcción para la edición del gen *CV1*. En este caso se diseñaron dos nuevos sgRNAs para dicho gen, y junto con el sgRNA-2, los tres sgRNAs fueron incorporados en una construcción para la transformación de soja mediada por *Agrobacterium*

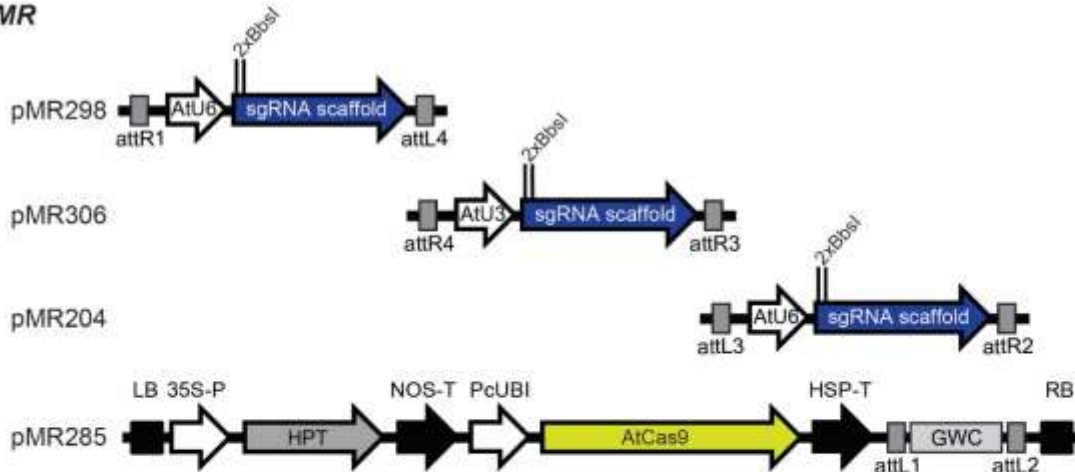


tumefaciens (Figura 6.C).

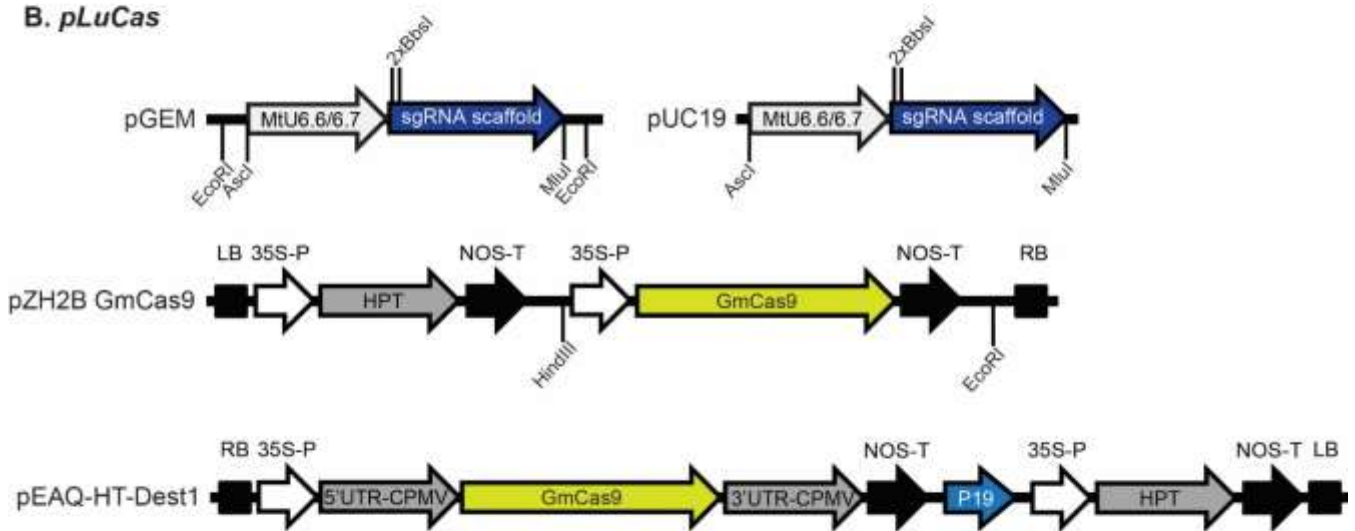
Figura 5. Ensayo de corte *in vitro*. **A.** Separación de los fragmentos cortados mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %. Los fragmentos de DNA de 1700-1800 bp fueron amplificados a partir de DNA genómico de la variedad Jack utilizando los primers FwPrCV1/FwPrCV2 y RvPrCV1/RvPrCV2. Se diseñaron tres sgRNAs. El sgRNA-1 tiene por blanco ambos genes CV, mientras que los sgRNA-2 y sgRNA-3 tienen por blanco los genes *CV1* y *CV2*, respectivamente. **B.** El DNA blanco fue incubado con la proteína SpCas9-GFP-MBP en presencia (+) o ausencia (-) de sgRNAs. MM: DNA genómico del fago λ digerido con *Pst*I. **C.** Secuencias blanco y secuencia guía del sgRNA (Target adaptor). Las secuencias PAM se encuentran subrayadas y las bases no pareadas entre el sgRNA-2 y sgRNA-3 se indican en rojo.

Herramientas para edición génica

A. pMR



B. pLuCas



C. Stupar Lab

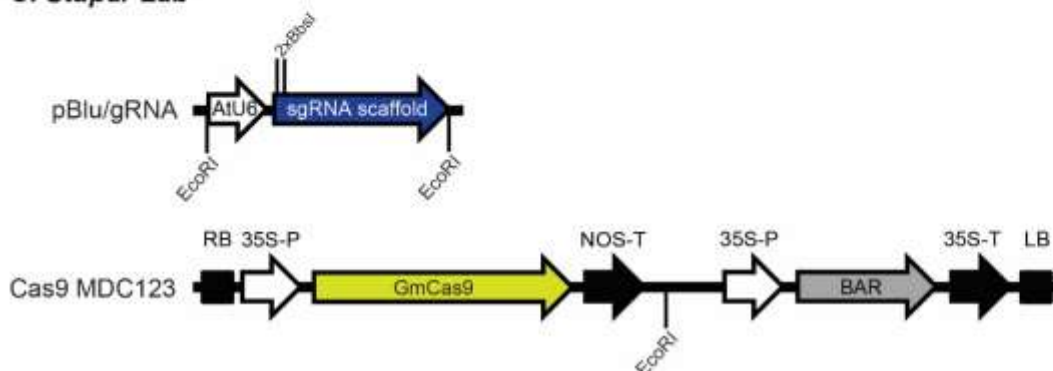


Figura 6. Construcciones generadas para la edición de los genes CV. A. Sistema de vectores de la serie pMR (modificado de Fauser et al., 2014). B. Vectores de la serie pLuCas conteniendo secuencias optimizadas para la expresión en leguminosas. C. Vector generado para la edición del gen CV1.

Figura 7. Genotipado de plantas de soja. **A.** PCR del gen de higromicina para la confirmación de la presencia de las construcciones. **B.** Resultado de HRFA de una línea en la que no se observó la presencia de mutaciones. **C.** Resultado de secuenciación de sanger de una línea en la que no se observó la presencia de mutaciones. Se muestran resultados representativos.

Esta construcción fue transformada en *A.tumefaciens* y empleada para realizar la transformación de nodos cotiledonares de soja, cultivar Williams 82 (Bernard y Cremeens, 1988). Al momento de presentar esta tesis, se logró regenerar aproximadamente 10 eventos, que están en etapa de exvitrición. Estos eventos deberán ser aclimatados para cultivo en tierra y genotipados.

Habiendo conseguido atravesar todos los pasos de transformación de nodos cotiledonares, se decidió generar una línea de soja que sobreexpresa la proteína Cas9 de forma constitutiva, de manera de acelerar el proceso de obtención de plantas editadas, facilitando la generación de construcciones e incrementando la eficiencia de edición. Dada la baja eficiencia de expresión del gen observada en los ensayos de transformación, se utilizó un sistema de hipertraducción de Cas9, basado en la utilización de regiones 5' UTR y 3' UTR, hipertraducibles provenientes del RNA2 del virus del mosaico del poroto, presentes en el vector pEAQ-HT (Sainsbury et al., 2009) (Figura 6.B). Esta construcción génica facilita la hipertraducción de Cas9 en la planta mediante el uso de secuencias virales y de supresores del silenciamiento. Además de ser utilizada para la transformación estable de soja, esta construcción puede ser empleada para la síntesis del RNA mensajero codificante para la proteína Cas9 (mRNA-Cas9).

8.3. MÉTODOS

Diseño de sgRNAs

Los sgRNAs fueron seleccionados utilizando las recomendaciones descritas en Ma et al., (2015) y Ma y Liu, (2016). Se seleccionó un sgRNA dirigido hacia el exón de ambos genes (sgRNA-1) un sgRNA dirigido hacia el exón 1 del gen *CV1* (sgRNA-2) y un sgRNA dirigido hacia el exón 1 del gen *CV2* (sgRNA-3). A las secuencias seleccionadas se les agregaron secuencias protruyentes Fw: 5'-GAGAGG + protoespaciador-3' y Rv: 5'- AAAC + protoespaciador + CC-3'. Los adaptadores fueron clonados en el vector pEn-Chimera T7 Expression mediante Golden Gate utilizando la enzima de restricción *BbsI* (Fauser et al., 2014).

Síntesis de sgRNA por transcripción *in vitro*

La transcripción *in vitro* (IVT: *in vitro transcription*) de los sgRNAs se realizó utilizando el kit TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Cat. K0441) siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA sintetizado se purificó utilizando el kit RNAeasy MinElute Cleanup (Quiagen, Cat. 74204).

Validación *in vitro* de los sgRNAs

Se prepararon reacciones para ensayos de corte de Cas9 como se describe en Fleitas et al., 2022 utilizando como blanco productos de PCR de los genes *GmCV1* y *GmCV2* de soja de la variedad Jack. Las secuencias correspondientes a cada gen fueron amplificadas utilizando la polimerasa Phusion HF (Thermo Cat no F530S) y los primers FwPrCV1: CACATATCACCGAAAAATAAATTAA y RvPrCV1: CGGAGACAAAATAGCTCTGGTTGG para *GmCV1* y FwPrCV2: ACGCGTCATGGTACTATATCCG y RvPrCV2: CTTCCCTTACGATTAAGTTGATCCG para *GmCV2*.

Generación de construcciones para edición los genes *GmCV1* y *GmCV2*

A) Serie de vectores pMR

Los vectores de la serie PMR (Fauser et al., 2014) fueron cedidos por la Dra. Hiromi Tajima (UC, Davis). Este sistema de vectores permite el ensamblado de múltiples target adaptors (TA) en una única construcción utilizando una reacción de recombinación ya que los mismos están basados en la tecnología Gateway (LR clonase plus enzyme mix, Cat. No. 12538-013).

Los tres TAs fueron clonados en los vectores pMR289 (sgRNA-1), pMR204 (sgRNA-2) y pMR306 (sgRNA-3). Los vectores pMR298 y pMR306 presentan el *scaffold* del sgRNA bajo el control de un promotor U6 de *A. thaliana*. El vector pMR204 contiene el *scaffold* del sgRNA bajo el control de un promotor U3 de *A. thaliana*. Este tándem fue clonado mediante LR múltiple en un vector binario pMR285, el cual permite la expresión de la proteína Cas9 con un uso de codones optimizado para *A. thaliana* (*AtCas9*) bajo control de un promotor de ubiquitina de perejil (*PcUBI*) y presenta un cassette de resistencia a higromicina (Figura 6.A).

B) Vectores conteniendo secuencias de leguminosas.

Se generó una serie de vectores para la expresión del sgRNA bajo control de los promotores U6.6 o U6.7 de *Medicago truncatula*. Se utilizó pZH2B (Hajdukiewicz et al., 1994) como vector de destino, al que se le agregó un

Herramientas para edición génica

cassette para la expresión del gen de *Cas9* optimizado para soja (*GmCas9*). Esta secuencia fue clonada a partir del vector pCas9MDC123 (Michno et al., 2015) y clonada entre los sitios *EcoRI* y *HindIII* del vector pZH2B. El vector pZH2B-*GmCas9* presenta un cassette de resistencia a higromicina como marcador de selección (Figura 6.B).

C) Construcciones para la edición *CV1*.

Con el fin de editar exclusivamente el gen *GmCV1*, tres nuevos sgRNAs fueron diseñados para editar ese gen utilizando los recursos web ccTop (Stemmer et al., 2015) y CRISPR-P 2.0 (Lei et al., 2014). Los sgRNAs fueron colocados bajo el control de los promotores U3 y U6 de *A. thaliana* y clonados en el vector Cas9MDC123 (Michno et al., 2015) el cual contiene un cassette para la expresión de la proteína *Cas9* optimizada para su expresión en soja bajo control de un promotor 2x35S y un cassette de resistencia a glufosinato de amonio como marcador de selección (Figura 6.C)

Generación de una construcción para hipertraducción de *GmCas9*

La secuencia codificante para la proteína *Cas9* optimizada para su expresión en soja fue extraída del vector pCas9MDC123 utilizando los sitios de restricción para las enzimas *Sall* y *NotI* y clonada entre los mismos sitios en el vector pENTR2B (Invitrogen, bla bla). La secuencia fue introducida en el vector pEAQ-Dest1 (Sainsbury et al., 2009) por recombinación LR. En este vector, la secuencia codificante para la proteína *GmCas9* queda flanqueada por las secuencias 5' y 3' UTR hipertraducibles provenientes del RNA2 del virus del mosaico del poroto (Figura 6.B).

Transformación de soja

Se transformaron embriones somáticos de soja de la variedad Jack por bombardeo de partículas de oro siguiendo el protocolo de Droste et al., 2002, utilizando las construcciones para edición génica en los vectores pMR285 y pZH2B-*GmCas9*.

Se transformaron nodos cotiledonares de la variedad Williams, utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, siguiendo el protocolo descrito por Li et al., 2017, utilizando la construcción en el vector Cas9MDC123. Se utilizaron 300 explantes.

Genotipado de soja

Se realizó el genotipado de las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos. Se realizaron extracciones de DNA utilizando un método de extracción con CTAB. Se corroboró la presencia del cassette de higromicina utilizando la polimerasa DFS taq (Bioron, cat. 101005) y los primers FwHyg: GAGCCTGACCTATTGCATCTC y RvHyg: GATGTTGGCGACCTCGTATT.

Herramientas para edición génica

En aquellas plantas que resultaron positivas para la presencia del transgen, se evaluó la presencia de mutaciones en los *loci* de interés mediante análisis de fragmentos de alta resolución (HRFA, *High Resolution Fragment Analysis*). Regiones correspondientes a cada uno de los loci fueron amplificadas utilizando un *primer forward* conteniendo un fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM):

FwCV1-FAM: CACGACGTTGTA AACGACACAAGCGTGTCCCTCTACTGG para *GmCV1* y FwCV2-FAM: CACGACGTTGTA AACGACCGACAAGTGTGTCCCTCTACTAT para *GmCV2*; y un primer reverso no marcado: RvCV1: CATAAATCCAATCCAGTACTAG para *GmCV1* y RvCV2: CAATAATTCGTTAGATATTTTTGGAGTTTTTC para *GmCV2*. Se utilizó la polimerasa Ranger mix (Bioline, BIO-25051).

Finalmente, en casos dudosos, se verificó el resultado de análisis de fragmentos por secuenciación por sanger de los loci de interés. Para ello, una región de cada *locus* comprendiendo la región blanco de edición fue amplificada por PCR utilizando los primers Fw: CTTTCGGATGTCTGTCAATTTTCAGAG y Rv: CGGAGACAAAATAGCTCTGGTTGG para *GmCV1* y Fw: ACGCGTCATGGTACTATATCCG y Rv: CTTCCCTTACGATTAAGTTGATCCG para *GmCV2*.

9. Discusión general y perspectivas

En este trabajo se caracterizó el perfil de expresión de las diversas rutas de degradación de componentes celulares en dos variedades de soja con comportamientos contrastantes en respuesta a estrés hídrico, durante la senescencia inducida por estrés. Asimismo, se profundizó en aspectos novedosos de la ruta de degradación mediada por CV, evidenciando que en soja los dos genes CV de soja exhiben patrones de expresión notoriamente distintos, lo que sugiere la especialización funcional de cada uno de ellos.

Los resultados también apuntan a que esta ruta, además de participar en la removilización de N durante el estrés y la senescencia natural, los genes CV también podrían estar participando dentro de programas de dPCD observados en diversos órganos de la planta y no solamente de la degradación de componentes cloroplásticos, como fue originalmente propuesto por Wang y Blumwald (2014). En este sentido, en el caso de la soja, sería especialmente interesante profundizar en aspectos funcionales relativos al rol de la ruta de vesiculación plastídica en la senescencia de la raíz y de los nódulos y en cómo la modulación de su expresión podría impactar en el uso del N.

La soja es la leguminosa cultivada más importante a nivel mundial. El elevado contenido de proteína en las semillas (aproximadamente el 40 %) representa un beneficio nutricional importante y explica la relevancia de este cultivo en la dieta humana y animal (Cordeiro y Echer, 2019). Al formar parte de las proteínas, el N es el nutriente más requerido por las plantas de soja. Se estima que el requerimiento es de 50 kg de N por tonelada de granos. Este N es principalmente aportado por la fijación biológica de N (80 %), la materia orgánica del suelo y la fertilización nitrogenada aplicada durante la siembra (20 %) (Hungria y Mendes, 2015). Dada su capacidad de fijar N, la soja es un cultivo relevante para mejorar la salud del suelo y es ampliamente utilizado en las prácticas de rotación de cultivos (Neupane et al., 2021).

La nodulación y la fijación de N son afectadas negativamente por la sequía. El rendimiento de la soja se ve particularmente afectado cuando la sequía ocurre durante la floración y el establecimiento de las vainas (James et al., 2019) momento en el que los nódulos están transcurriendo la senescencia (Marquez-García et al., 2015). Existe una fuerte correlación entre los parámetros de la raíz y los nódulos y la biomasa acumulada en la parte aérea en variedades de soja tolerantes a la sequía (Fenta et al., 2012, 2014).

Los programas de senescencia activados en los nódulos son similares a los presentes en las hojas teniendo en cuenta el perfil de activación transcripcional en este proceso, donde se incluyen muchos genes que participan en procesos de degradación de proteínas, entre ellos muchas proteasas de cisteína con

Discusión general y perspectivas

elevada homología con SAG12 (Van de Velde et al., 2006). Van de Velde et al. (2006) propusieron que esto podría tener una explicación desde el punto de vista evolutivo, ya que existe cierto paralelismo entre la formación de los cloroplastos y los nódulos: los cloroplastos derivan de un antecesor procarionta que era capaz de fijar C y que gradualmente evolucionó en un organelo (McFadden y van Dooren., 2004); los simbiontes pueden ser considerados un organelo fijador de N adquirido por transferencia horizontal, y que podría representar una fase intermedia en un proceso de evolución similar bacteria-organelo vegetal.

Muchos tipos de estrés pueden desatar la senescencia de los nódulos prematuramente (Gogorcena et al., 1997; Matamoros et al., 1999; Gálvez et al., 2005) y esta senescencia se desarrolla más rápidamente que la senescencia natural y presenta elementos de estrés oxidativo y muerte celular (Puppo et al., 2005). Es posible especular que la extensión del período de fijación de N y una senescencia retrasada de los nódulos en condiciones de estrés podrían resultar benéficas para el rendimiento y la calidad de la semilla. Es necesario realizar experimentos para confirmar si las proteínas CV tienen un rol en la senescencia de los nódulos. No obstante, la activación transcripcional de los genes CV de soja durante diversos procesos de senescencia hace pensar que al eliminar la expresión de al menos alguno de estos genes, sería posible obtener plantas con senescencia retrasada de los nódulos también.

Con el fin de profundizar en el rol de los genes CV de soja, muchas de las perspectivas que quedan planteadas implican la obtención de plantas *knock out* para los genes CV, donde se espera evaluar la senescencia natural y la inducida por estrés. Será importante determinar que las relaciones fuente-fosa se mantengan inalteradas durante la senescencia natural en estas plantas.

En un futuro, también será interesante ampliar el conocimiento sobre cuál es la contribución de las rutas vesiculares que participan en la degradación de componentes celulares durante la senescencia natural de la soja. Además, se deberá evaluar si existe una correlación entre la ruta que se encuentra más representada en las respuestas al estrés en soja y el contenido de proteína en el grano. Para abordar esta pregunta, se propone comparar dos genotipos de soja del mismo grupo de madurez y rendimiento similar, pero cuyo contenido de proteína en grano es contrastante. Se analizará progresión de la senescencia natural en la etapa reproductiva de plantas de soja nodulada y se analizarán simultáneamente las rutas vesiculares de degradación. Se realizarán mediciones que apunten a generar un mapa espacial con información bioquímica y de expresión de genes que permita describir lo que está ocurriendo con la movilización de nutrientes y con la activación de las rutas de degradación (autofagia, SAVs, ATI1 y CV).

Discusión general y perspectivas

Complementariamente, con el fin de determinar de qué manera las proteínas CV cumplen sus funciones en la raíz, se determinarán los interactores de estas proteínas en raíces transgénicas que expresen construcciones que permita capturar los interactores de CV en ese órgano. Para ello, se generarán construcciones que permitan la expresión de CV1 y CV2 bajo el control de sus promotores endógenos y como fusión a citrina. Estas construcciones serán utilizadas para transformar cotiledones de soja utilizando *A. rhizogenes* y se trabajará con plantas híbridas (con raíces transgénicas y parte aérea *wild type*) para obtener los interactores en condiciones control y durante el estrés hídrico.

En este trabajo se desarrollaron una serie de herramientas para llevar adelante la edición génica de la soja. Si bien no fue posible generar las plantas editadas hasta el momento, este proceso dejó varios aprendizajes que han permitido mejorar nuestros procedimientos.

Primero, fue posible reproducir un protocolo para la evaluación de los sgRNAs diseñados. El análisis *in vitro* de los sgRNAs previamente a su incorporación a una construcción tiene varias ventajas:

- 1) Permite descartar sgRNAs inactivos. Que un sgRNA sea activo en un ensayo *in vitro* no garantiza que sea activo en un sistema *in vivo*, donde la secuencia blanco estará en un contexto genómico particular. No obstante, si un sgRNA no es activo *in vitro*, definitivamente no lo será *in vivo*. En este sentido, probar la eficacia de los sgRNAs aumenta la probabilidad de éxito en la edición.
- 2) Para muchos organismos vegetales no existe un sistema transitorio que permita evaluar los sgRNAs *in vivo* antes de comenzar a ensamblar construcciones y transformar plantas. En nuestro laboratorio, recientemente hemos incorporado el método de transformación de *hairy roots* por *Agrobacterium rhizogenes* y hemos generado un sistema de vectores que nos permite rápidamente y utilizando un único paso de clonado, evaluar los nuevos sgRNAs *in vivo*. Esta no era la situación cuando comenzamos a trabajar con el sistema CRISPR/Cas9, por lo que validar *in vitro* los sgRNAs que se estaban empleando era el único paso de validación posible.
- 3) En nuestro caso particular, el uso de una forma la proteína Cas9 fusionada a GFP y MBP, facilitó la purificación, por hacerla vistosa y resolver el problema de la solubilidad de la proteína, descrita por otros protocolos. La proteína almacenada permanece activa por años. Asimismo, es posible eliminar la MBP por corte con la proteasa TEV, produciendo una proteína que ya ha sido utilizada para realizar edición génica mediada por RNPs en otros organismos, y libre de glicerol, lo que es reportado como un inconveniente para quienes utilizan este sistema.

Discusión general y perspectivas

Varios motivos podrían explicar la falta de éxito para obtener eventos editados en los primeros intentos. Por un lado, el método para transformar las construcciones generadas fue la biolística. En el caso particular de la soja, los trabajos publicados sugieren que la mayor eficiencia de transformación se obtiene mediante el uso de esta metodología como estrategia de introducción del DNA a las células vegetales (Santarem y Finer, 1999; Araga et al., 2000; Droste et al. 2002). No obstante, los primeros vectores con los que contamos, el pMR285 y el pZH2B-GmCas9, no estaban diseñados específicamente para ser entregados por esa metodología, sino que las construcciones finales son vectores binarios de más de 14 kb. En general, cuando se trata de integrar un transgen en el genoma de una planta, el patrón de integración es más simple cuando se utiliza *Agrobacterium tumefaciens* (menor número de copias y menor fraccionamiento de la construcción), lo que explica por qué la transformación mediada por *Agrobacterium* es preferida sobre la biolística (Hwang et al., 2017). El fraccionamiento de la construcción génica puede explicar la baja eficiencia de edición obtenida. Este problema puede solucionarse cambiando la metodología de transformación o utilizando construcciones más pequeñas para realizar el bombardeo. En el marco de este trabajo se logró reproducir el protocolo de transformación de nodos cotiledonares descrito por Li et al., 2017. Como dato interesante, una publicación reciente de un grupo nucleado por la empresa Corteva, ha descrito la transformación de soja mediada por la bacteria no fitopatógena *Ochrobactrum haywardense* H1 (*Oh* H1) (Cho et al., 2022). El trabajo describe la ingeniería de la bacteria con la maquinaria *vir* de *Agrobacterium* y muestra la transformación eficiente y en copia única, de varios cultivares élite de Corteva, con eficiencias que alcanzan el 35 %. Usando un sistema de excisión inducible por *heat shock*, el trabajo describe la obtención de plantas transgénicas libres de marcador de selección y *backbone* de vector. Si bien no es fácil para la academia acceder a este tipo de desarrollo biotecnológico generado por una empresa, la posibilidad de transformar cultivares élite con una eficiencia tan elevada y libre de *backbone*, es al menos alentadora para perfeccionar las metodologías de edición génica de soja en el futuro.

Se han llevado adelante varios intentos para producir plantas con senescencia retardada. Sin embargo, el retraso de la senescencia puede tener efectos contrastantes según la especie. Por ejemplo, en el tabaco, la longevidad prolongada de las hojas da como resultado una mayor acumulación de biomasa y rendimiento tanto en condiciones normales (Madoka et al., 2002) como en condiciones severas de déficit de agua (Rivero et al., 2007). Por el contrario, en trigo y arroz, donde el llenado efectivo del grano finaliza antes de la culminación de la senescencia foliar, un retraso en la senescencia, es decir, una restricción en la removilización de C y N, puede reducir el índice de cosecha y la tasa de llenado del grano (Gong et al., 2005; Chang et al., 2017).

Discusión general y perspectivas

Varias líneas de investigación han apuntado a proteínas relacionadas con la autofagia, SAVs y ATI-PS, como objetivos potenciales para retrasar la senescencia, en la mayoría de los casos con resultados insatisfactorios. Se ha observado senescencia acelerada en varios mutantes deficientes en autofagia. Este es el caso de los mutantes de *Arabidopsis* en ATG7 (Doelling et al., 2002), ATG4 (Hanaoka et al., 2002), ATG5 (Thompson et al., 2005), ATG10 (Phillips et al., 2008) y el mutante de ATG12 en maíz (Li et al., 2015). Entre estos, los genes ATG7, ATG8H, ATG8A y ATG8B muestran un aumento rápido y coordinado en etapas tempranas de la senescencia (Buchanan et al., 2005). En este sentido, la autofagia podría cumplir un doble papel promoviendo o retrasando la muerte celular. Al eliminar los desechos celulares, la autofagia puede ser esencial para la longevidad celular, pero la actividad autofágica excesiva puede llevar a la muerte celular (Guiboileau et al., 2013).

Como es el caso de los mutantes de autofagia, los mutantes de *Arabidopsis* ATI-KD (en los que se eliminó ATI1 y se silenció ATI2; Honig et al., 2012) muestran una senescencia acelerada en condiciones de estrés salino (Michaeli et al., 2014). Además, ATI1 tampoco está exclusivamente involucrado en la degradación de las proteínas del cloroplasto, ya que también se encuentra en cuerpos asociados con el retículo endoplásmico que se transportan a la vacuola, lo que sugiere que puede desempeñar un papel en otros procesos celulares (Honig et al., 2012).

SAG12 es la principal proteasa que se induce en las hojas senescentes de *A. thaliana* y *Brassica napus*, especialmente bajo restricción de N (Desclos et al., 2008; Poret et al., 2016) y se acumula dentro de las SAV (Otegui et al., 2005). Por estas razones, se ha propuesto que SAG12 tiene un papel central durante el proceso de senescencia, pero se ha observado que los mutantes KO (*sag12*) no muestran alteración en la formación o actividad proteolítica de las SAVs (Otegui et al., 2005) ni tampoco un fenotipo de senescencia alterado (James et al., 2018). Bajo un suministro normal de N, los mutantes *sag12* mantienen el llenado de la semilla inalterado. No obstante, los mutantes *sag12* muestran un menor rendimiento y contenido de N en la semilla cuando crecen bajo restricción de N. James et al. (2019) determinaron que los mutantes *sag12* presentan una alteración en la removilización de N desde las raíces hacia las semillas. Estos resultados demostraron que SAG12 juega un papel importante en la proteólisis de las proteínas de la raíz que sirven como fuente de N en condiciones de restricción de N (James et al., 2019; Buet et al., 2019).

Los resultados con la ruta CCV son, por su parte, más alentadores. La ruta de CV participa en la degradación de proteínas tilacoides y estromales independientemente de la autofagia o de las SAVs. La proteína CV contiene un péptido para la localización cloroplástica y solo parece estar unida al cloroplasto y a las CCVs. El silenciamiento de CV en *Arabidopsis* aumentó la

Discusión general y perspectivas

estabilidad de los cloroplastos durante el estrés, confiriendo mayor tolerancia al estrés (Wang y Blumwald, 2014). Sade et al. (2018) confirmaron estas observaciones en plantas de arroz en las que se silenció el gen OsCV. Las plantas RNAiOsCV mantuvieron sus granas intactas y pudieron mantener los procesos de asimilación primaria de N, mostrando un mejor rendimiento en condiciones de déficit hídrico. Los resultados revelaron el papel de CV en el recambio de enzimas que están asociadas con la asimilación de N durante el estrés, lo que lleva a una disminución de la asimilación de N y afecta la fotorrespiración. La interacción directa de OsCV y GS2 estromal fue confirmada *in vivo* (Sade et al., 2018). En general, las líneas de evidencia apuntan a la idea de que las proteínas CV juegan un papel importante en la degradación de los cloroplastos y la senescencia prematura de las hojas durante el estrés y que el silenciamiento de CV mejoraría la tolerancia al estrés hídrico de la planta al mantener la función del cloroplasto y la asimilación de C y N durante los episodios de estrés.

En el caso de la soja, la presencia de dos genes con perfiles de expresión y regulación transcripcional divergentes, alimentan la idea de que retrasar la senescencia inducida por el estrés manteniendo la senescencia natural intacta es potencialmente viable. Si bien no es posible descartar que exista un mecanismo compensatorio, los resultados obtenidos en este trabajo nos alientan a seguir por el camino de la edición de los genes CV de soja, en particular del gen CV1, como estrategia para mejorar el rendimiento en condiciones de estrés.

10. REFERENCIAS

1. Abdel-Haleem H, Carter TE Jr, Purcell LC, King CA, Ries LL, Chen P, Schapaugh W Jr, Sinclair TR, Boerma HR. Mapping of quantitative trait loci for canopy-wilting trait in soybean (*Glycine max* L. Merr). *Theor Appl Genet.* 2012 Sep;125(5):837-46. doi: 10.1007/s00122-012-1876-9.
2. Andersson M, Turesson H, Olsson N, Fält AS, Ohlsson P, Gonzalez MN, Samuelsson M, Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol Plant.* 2018 Dec;164(4):378-384. doi: 10.1111/ppl.12731.
3. Anders C, Jinek M. In vitro enzymology of Cas9. *Methods Enzymol.* 2014;546:1-20. doi: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00001-5.
4. Anuario estadístico agropecuario MGAP 2021. Disponible en línea: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presento-anuario-estadistico-agropecuario-2021>
5. Aoyama S, Huarancca Reyes T, Guglielminetti L, Lu Y, Morita Y, Sato T, Yamaguchi J. Ubiquitin ligase ATL31 functions in leaf senescence in response to the balance between atmospheric CO₂ and nitrogen availability in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2014 Feb;55(2):293-305. doi: 10.1093/pcp/pcu002.
6. Atlas global de brechas, 2021. Disponible en línea: <https://www.yieldgap.org/gygaviewer/index.html>. Fecha de acceso: 10/7/2022.
7. Atkins PA, Voytas DF. Overcoming bottlenecks in plant gene editing. *Curr Opin Plant Biol.* 2020 Apr;54:79-84. doi: 10.1016/j.pbi.2020.01.002.
8. Badenoch-Jones J, Parker CW, Letham DS, Singh S. Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in derooted seedlings of oat and wheat. *Plant Cell & Environment* 1996 19, 504–516. doi: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00384.x
9. Balazadeh S, Wu A, Mueller-Roeber B. Salt-triggered expression of the ANAC092-dependent senescence regulon in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 2010 Jun;5(6):733-5. doi: 10.4161/psb.5.6.11694.
10. Balazadeh S, Parlitz S, Mueller-Roeber B, Meyer RC. Natural developmental variations in leaf and plant senescence in *Arabidopsis*

Referencias

- thaliana. *Plant Biol (Stuttg)*. 2008 Sep;10 Suppl 1:136-47. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00108.x.
11. Bang SW, Lee DK, Jung H, Chung PJ, Kim YS, Choi YD, Suh JW, Kim JK. Overexpression of OsTF1L, a rice HD-Zip transcription factor, promotes lignin biosynthesis and stomatal closure that improves drought tolerance. *Plant Biotechnol J*. 2019 Jan;17(1):118-131. doi: 10.1111/pbi.12951.
 12. Banakar R, Schubert M, Kurgan G, Rai KM, Beaudoin SF, Collingwood MA, Vakulskas CA, Wang K, Zhang F. Efficiency, Specificity and Temperature Sensitivity of Cas9 and Cas12a RNPs for DNA-free Genome Editing in Plants. *Front Genome Ed*. 2022 Jan 12;3:760820. doi: 10.3389/fgeed.2021.760820.
 13. Bernard RL, Cremeens CR. Registration of "Williams 82" soybean. *Crop sci* 1988 28 (6): 1027-1028. doi: 10.2135/cropsci1988.0011183X002800060049x.
 14. Beznec A, Faccio P, Miralles DJ, Abeledo LG, Oneto CD, Garibotto MB, Gonzalez G, Moreyra F, Elizondo M, Ruíz M, Lewi D, Blumwald E, Llorente B, Paleo AD, Bossio E. Stress-induced expression of IPT gene in transgenic wheat reduces grain yield penalty under drought. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021 May 10;19(1):67. doi: 10.1186/s43141-021-00171-w.
 15. Bogeat-Triboulot MB, Brosché M, Renaut J, Jouve L, Le Thiec D, Fayyaz P, Vinocur B, Witters E, Laukens K, Teichmann T, Altman A, Hausman JF, Polle A, Kangasjärvi J, Dreyer E. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiol*. 2007 Feb;143(2):876-92. doi: 10.1104/pp.106.088708.
 16. Boonman A, Anten NPR, Dueck TA, Jordi WJRM, van der Werf A, Voeselek LACJ, Pons TL. Functional significance of shade-induced leaf senescence in dense canopies: an experimental test using transgenic tobacco. *Am Nat* (2006) 168(5): 597-607. doi: 10.1086/508633
 17. Borland AM, Hartwell J, Weston DJ, Schlauch KA, Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Yang X, Cushman JC. Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. *Trends Plant Sci*. 2014 May;19(5):327-38. doi: 10.1016/j.tplants.2014.01.006.

Referencias

18. Borniego ML, Molina MC, Guiamét JJ, Martínez DE. Physiological and proteomic changes in the apoplast accompany leaf senescence in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* (2020) 10: doi: 10.3389/fpls.2019.01635.
19. Bortesi L, Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv.* 2015 Jan-Feb;33(1):41-52. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006.
20. Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim YS, Penfold CA, Jenkins D, Zhang C, Morris K, Jenner C, Jackson S, Thomas B, Tabrett A, Legaie R, Moore JD, Wild DL, Ott S, Rand D, Beynon J, Denby K, Mead A, Buchanan-Wollaston V. High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell*. 2011 Mar;23(3):873-94. doi: 10.1105/tpc.111.083345
21. Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2005 May;42(4):567-85. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02399.x.
22. Buet AM, Costa L, Martínez DE, Guiamet JJ. Chloroplast protein degradation in senescing leaves: proteases and lytic compartments. *Front Plant Sci* (2019) 10: doi: 10.3389/fpls.2019.00747.
23. Carrow, R. N. Drought avoidance characteristics of diverse tall freescure cultivars. *Crop Sci* 1996 36:371-377. doi: 10.2135/cropsci1996.0011183X003600020026x.
24. Carter TE, Burton JW, Bowman DT, Cui Z, Zhou X, Villagarcia MR, Niewoehner AS, Fountain MO. Registration of 'N7001' Soybean. *Crop Sci* (2003) 43:1126-1127. doi: 10.2135/cropsci2003.1126.
25. Chang TG, Zhu XG, Raines C. Source-sink interaction: a century old concept under the light of modern molecular systems biology. *J Exp Bot.* 2017 Jul 20;68(16):4417-4431. doi: 10.1093/jxb/erx002.
26. Charlson DV, Bhatnagar S, King CA, Ray JD, Sneller CH, Carter TE Jr, Purcell LC. Polygenic inheritance of canopy wilting in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Theor Appl Genet.* 2009 Aug;119(4):587-94. doi: 10.1007/s00122-009-1068-4.

Referencias

27. Cheng Y, Dai X, Zhao Y. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2006 Jul 1;20(13):1790-9. doi: 10.1101/gad.1415106.
28. Cheng Y, Dai X, Zhao Y. Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2007 Aug;19(8):2430-9. doi: 10.1105/tpc.107.053009.
29. Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T. Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 2003 Sep;44(9):914-21. doi: 10.1093/pcp/pcg118.
30. Cho HJ, Moy Y, Rudnick NA, Klein TM, Yin J, Bolar J, Hendrick C, Beatty M, Castañeda L, Kinney AJ, Jones TJ, Chilcoat ND. Development of an efficient marker-free soybean transformation method using the novel bacterium *Ochrobactrum haywardense* H1. *Plant Biotechnol J.* 2022 May;20(5):977-990. doi: 10.1111/pbi.13777.
31. Cohen M, Davydov O, Fluhr R. Plant serpin protease inhibitors: specificity and duality of function. *J Exp Bot.* 2019 Apr 12;70(7):2077-2085. doi: 10.1093/jxb/ery460.
32. Cordeiro CFDS, Echer FR. Interactive Effects of Nitrogen-Fixing Bacteria Inoculation and Nitrogen Fertilization on Soybean Yield in Unfavorable Edaphoclimatic Environments. *Sci Rep.* 2019 Oct 30;9(1):15606. doi: 10.1038/s41598-019-52131-7. Erratum in: *Sci Rep.* 2020 Jul 21;10(1):12115. doi: 10.1038/s41598-019-52131-7.
33. Cramer G, Ergül A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall EAR, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, Quilici D, Schlauch KA, Schooley DA, Cushman JC. Water and salinity stress in grapevines, early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Func Integr Genom* 2007 7: 111-134. doi: 10.1007/s10142-006-0039-y.
34. Daneva A, Gao Z, Van Durme M, Nowack MK. Functions and Regulation of Programmed Cell Death in Plant Development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2016 Oct 6;32:441-468. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-124915
35. Dasgupta K, Khadilkar AS, Sulpice R, Pant B, Scheible WR, Fisahn J, Stitt M, Ayre BG. Expression of Sucrose Transporter cDNAs Specifically in Companion Cells Enhances Phloem Loading and Long-Distance

Referencias

- Transport of Sucrose but Leads to an Inhibition of Growth and the Perception of a Phosphate Limitation. *Plant Physiol.* 2014 Jun;165(2):715-731. doi: 10.1104/pp.114.238410.
36. Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry JF, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. *Plant Physiol.* 2005 Jun;138(2):898-908. doi: 10.1104/pp.105.060764.
37. Décima Oneto C, Otegui ME, Baroli I, Beznec A, Faccio P, Bossio E, Blumwald E, Lewi D. Water deficit stress tolerance in maize conferred by expression of an isopentenyltransferase (IPT) gene driven by a stress- and maturation-induced promoter. *J Biotechnol.* 2016 Feb 20;220:66-77. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.01.014.
38. Desclos M, Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Bonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice JC. A combined ¹⁵N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics* 2009 9: 3580-3608. doi: 10.1002/pmic.200800984
39. Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):33105-14. doi: 10.1074/jbc.M204630200.
40. Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica* 2002 127, 367–376. doi:10.1023/A:1020370913140.
41. Eom JS, Chen LQ, Sosso D, Julius BT, Lin IW, Qu XQ, Braun DM, Frommer WB. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr Opin Plant Biol.* 2015 Jun;25:53-62. doi: 10.1016/j.pbi.2015.04.005.
42. Espina MJ, Ahmed CMS, Bernardini A, Adeleke E, Yadegari Z, Arelli P, Pantalone V, Taheri A. Development and Phenotypic Screening of an Ethyl Methane Sulfonate Mutant Population in Soybean. *Front Plant Sci.* 2018 Mar 29;9:394. doi: 10.3389/fpls.2018.00394.
43. Fang Y, Du Y, Wang J, Wu A, Qiao S, Xu B, Zhang S, Siddique KHM, Chen Y. Moderate drought stress affected root growth and grain yield in

Referencias

- old, modern and newly released cultivars of winter wheat. *Front Plant Sci* (2017) 8(672), doi: 10.3389/fpls.2017.00672.
44. FAO. 2021. World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2021. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb4477en>
45. FAOSTAT. Disponible en línea: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>. Fecha de acceso: 10/7/2022.
46. Farmer LM, Rinaldi MA, Young PG, Danan CH, Burkhart SE, Bartel B. Disrupting autophagy restores peroxisome function to an Arabidopsis lon2 mutant and reveals a role for the LON2 protease in peroxisomal matrix protein degradation. *Plant Cell*. 2013 Oct;25(10):4085-100. doi: 10.1105/tpc.113.113407.
47. Fauser F., Schiml S. and Puchta H. (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 79: 348–359. doi: 10.1111/tpj.12554.
48. Fenta BA, Driscoll SP, Kunert HJ, Foyer CH. Characterization of drought-tolerance traits in nodulated soya beans: the importance of maintaining photosynthesis and shoot biomass under drought-induced limitations on nitrogen metabolism. *J. Agron Crop Sci* 2012 198: 92-103. doi: 10.1111/j.1439-037X.2011.00491.x.
49. Fenta BA, Beebe SE, Kunert HJ, Burrige JD, Barlow KM, Lynch JP, Foyer CH. Field phenotyping of soybean roots for drought stress tolerance. *Agronomy* (2014) 4: 418-435. doi: 10.3390/agronomy4030418.
50. Figueroa CM, Lunn JE. A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose. *Plant Physiol*. 2016 Sep;172(1):7-27. doi: 10.1104/pp.16.00417.
51. Fleitas AL, Señorale M, Vidal S. A Robust Expression and Purification Method for Production of SpCas9-GFP-MBP Fusion Protein for In Vitro Applications. *Methods Protoc*. 2022 May 28;5(3):44. doi: 10.3390/mps5030044.
52. Fletcher AL, Sinclair TR, Allen LH. Transpiration responses to vapour pressure deficit in well-watered 'slow-wilting' and commercial soybean. *Env Exp Bot*. 2007 61, 145–151. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.05.004.
53. Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J Exp Bot*. 2012 Feb;63(4):1637-61. doi: 10.1093/jxb/ers013

Referencias

54. Gallino JP, Ruibal C, Casaretto E, Fleitas AL, Bonnacarrère V, Borsani O, Vidal S. A dehydration-induced eukaryotic translation initiation factor iso4G identified in a slow wilting soybean cultivar enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* (2018a) 9:262. doi: 10.3389/fpls.2018.00262.
55. Gallino JP, Rivero Y, Ruibal C, Fleitas AL, Castillo A, Cerretta S, Casaretto E, Borsani O, Vidal S. *Biología Aplicada al mejoramiento genético de la soja*. FPTA N° 68, ISBN: 9978-9974-38-409-5.
56. Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J Exp Bot*. 2005 Sep;56(419):2551-61. doi: 10.1093/jxb/eri249.
57. Gepstein S, Glick BR. Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Mol Biol*. 2013 Aug;82(6):623-33. doi: 10.1007/s11103-013-0038-z.
58. Ghneim-Herrera T, Selvaraj MG, Meynard D, Fabre D, Peña A, Romdhane WB, Saad RB, Ogawa S, Rebolledo MC, Ishitani M, Tohme J, Al-Doss A, Guiderdoni E, Hassairi A. Expression of the *Aeluropus littoralis* AISAP gene enhances rice yield under field drought at the reproductive stage. *Front Plant Sci* (2017) 8, 994, doi: 10.3389/fpls.2017.00994.
59. Gogorcena Y, Gordon AJ, Escuredo PR, Minchin FR, Witty JF, Moran JF, Becana M. N₂ Fixation, Carbon Metabolism, and Oxidative Damage in Nodules of Dark-Stressed Common Bean Plants. *Plant Physiol*. 1997 Apr;113(4):1193-1201. doi: 10.1104/pp.113.4.1193.
60. Gomez FM, Carrión CA, Costa ML, Desel C, Kieselbach T, Funk C, Krupinska K, Guamet J. Extra-plastidial degradation of chlorophyll and photosystem I in tobacco leaves involving 'senescence-associated vacuoles'. *Plant J*. 2019 Aug;99(3):465-477. doi: 10.1111/tpj.14337.
61. Gomez Mansur NM, Pena LB, Bossio AE, Lewi DM, Beznec AY, Blumwald E, Arbona V, Gómez-Cadenas A, Benavides MP, Gallego SM. An isopentenyl transferase transgenic wheat isolate exhibits less seminal root growth impairment and a differential metabolite profile under Cd stress. *Physiol Plant*. 2021 Sep;173(1):223-234. doi: 10.1111/ppl.13366.
62. Gong YH, Zhang J, Gao JF, Lu JY, Wang JR. Slow export of photoassimilate from stay-green leaves during late grain-filling stage in

Referencias

- hybrid winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Agron Crop Sci* (2005) 191: 292-299. doi: 10.1111/j.1439-037X.2005.00173.x.
63. González FG, Rigalli N, Miranda PV, Romagnoli M, Ribichich KF, Trucco F, Portapila M, Otegui ME, Chan RL. 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.* 2020 Mar 6;11:178. doi: 10.3389/fpls.2020.00178.
64. Guiamét JJ, Giannibelli MC. Inhibition of the degradation of chloroplast membranes during senescence in nuclear "stay green" mutants of soybean. *Physiol Plant.* 1994, 91(3): 395-402. doi: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb02966.x.
65. Guiamét JJ, Giannibelli MC. Nuclear and cytoplasmic "stay-green" mutations of soybean alter the loss of leaf soluble proteins during senescence. *Physiol Plant.* 1996, 96: 655-661. doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00239.x.
66. Guiamét JJ, Schwartz E, Pichersky E, Noodén LD. Characterization of Cytoplasmic and Nuclear Mutations Affecting Chlorophyll and Chlorophyll-Binding Proteins during Senescence in Soybean. *Plant Physiol.* 1991 May;96(1):227-31. doi: 10.1104/pp.96.1.227.
67. Guiboileau A, Avila-Ospina L, Yoshimoto K, Soulay F, Azzopardi M, Marmagne A, Lothier J, Masclaux-Daubresse C. Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in *Arabidopsis* leaves depending on nitrate availability. *New Phytol* (2013) 199: 683-694. doi: 10.1111/nph.12307.
68. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell.* 2004 Dec 17;119(6):753-66. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.038.
69. Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends Plant Sci.* 2012 Mar;17(3):172-9. doi: 10.1016/j.tplants.2011.12.005.
70. Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kühn C. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant J.* 2006 Jan;45(2):180-92. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02572.x.

Referencias

71. Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol*. 1994 Sep;25(6):989-94. doi: 10.1007/BF00014672.
72. Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiol*. 2002 Jul;129(3):1181-93. doi: 10.1104/pp.011024.
73. Harrison MT, Tardieu F, Dong Z, Messina CD, Hammer GL. Characterizing drought stress and trait influence on maize yield under current and future conditions. *Glob Chang Biol*. 2014 Mar;20(3):867-78. doi: 10.1111/gcb.12381.
74. Hillwig MS, Contento AL, Meyer A, Ebany D, Bassham DC, Macintosh GC. RNS2, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 18;108(3):1093-8. doi: 10.1073/pnas.1009809108.
75. Honig A, Avin-Wittenberg T, Ufaz S, Galili G. A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of *Arabidopsis* plants to carbon starvation. *Plant Cell*. 2012 Jan;24(1):288-303. doi: 10.1105/tpc.111.093112.
76. Hörtensteiner S, Feller U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot*. 2002 Apr;53(370):927-37. doi: 10.1093/jexbot/53.370.927.
77. Hörtensteiner S. Chlorophyll degradation during senescence. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57:55-77. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105212.
78. Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J Exp Bot*. 2008;59(11):2991-3007. doi: 10.1093/jxb/ern155.
79. Hudak CM, Patterson RP. 1995. Vegetative growth analysis of a drought resistant soybean plant introduction. *Crop Science* 35, 464–471. doi: 10.2135/cropsci1995.0011183X003500020031x.
80. Hungria, M. & Mendes, I. C. Nitrogen fixation with soybean: The perfect symbiosis? In: de Bruijn, F. J., editor, *Biological nitrogen fixation*. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ. 1009–1024, doi: 10.1002/9781119053095.ch99 (2015).

Referencias

81. Hwang S, King CA, Chen P, Ray J, Cregan P, Carter T, Li Z, Abdelhaleem H, Matson K, Schapaugh W, Purcell L. Meta-analysis to refine map position and reduce confidence intervals for delayed-canopy-wilting QTLs in soybean. *Mol Breeding* 2016 36, 91. doi:10.1007/s11032-016-0516-5.
82. Hwang S, King CA, Ray JD, Cregan PB, Chen P, Carter TE Jr, Li Z, Abdel-Haleem H, Matson KW, Schapaugh W Jr, Purcell LC. Confirmation of delayed canopy wilting QTLs from multiple soybean mapping populations. *Theor Appl Genet.* 2015 Oct;128(10):2047-65. doi: 10.1007/s00122-015-2566-1.
83. Hyten DL, Song Q, Zhu Y, Choi IY, Nelson RL, Costa JM, Specht JE, Shoemaker RC, Cregan PB. Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 7;103(45):16666-71. doi: 10.1073/pnas.0604379103.
84. Informe anual de comercio exterior de Uruguay 2021. Disponible en línea en: <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/centro-informacion/articulo/informe-anual-de-comercio-exterior-de-uruguay-2021/>
85. IPCC, 2019: Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems [Shukla PR, Skea J, Calvo Buendia E, Masson-Delmotte V, Pörtner HO, Roberts DC, Zhai P, Slade R, Connors S, van Diemen R, Ferrat M, Haughey E, Luz S, Neogi S, Pathak M, Petzold J, Portugal Pereira J, Vyas P, Huntley E, Kissick K, Belkacemi M, Malley J (eds.)]. In press. Disponible en línea: <https://www.ipcc.ch/srccl/>
86. ISAAA, 2022. Disponible en línea: <https://www.isaaa.org/default.asp>. Fecha de acceso: 6/7/2022.
87. Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T. Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.* 2008 Sep;148(1):142-55. doi: 10.1104/pp.108.122770.
88. Itam M, Mega R, Tadano S, Abdelrahman M, Matsunaga S, Yamasaki Y, Akashi K, Tsujimoto H. Metabolic and physiological responses to progressive drought stress in bread wheat. *Sci Rep.* 2020 Oct 14;10(1):17189. doi: 10.1038/s41598-020-74303-6.

Referencias

89. Izumi M, Ishida H. The changes of leaf carbohydrate contents as a regulator of autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies during leaf senescence. *Plant Signal Behav.* 2011 May;6(5):685-7. doi: 10.4161/psb.6.5.14949.
90. James M, Masclaux-Daubresse C, Marmagne A, Azzopardi M, Lainé P, Goux D, Etienne P, Trouverie J. A new role for SAG12 cysteine protease in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* (2019) 9: doi: 10.3389/fpls.2018.01998.
91. James M, Poret M, Masclaux-Daubresse C, Marmagne A, Coquet L, Jouenne T, Chan P, Trouverie J, Etienne P. SAG12, a Major Cysteine Protease Involved in Nitrogen Allocation during Senescence for Seed Production in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2018 Oct 1;59(10):2052-2063. doi: 10.1093/pcp/pcy125.
92. Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, Do Choi Y, Kim M, Reuzeau C, Kim JK. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiol.* 2010 May;153(1):185-97. doi: 10.1104/pp.110.154773.
93. Jones MM, Turner NC y Osmond CB. (1981) Mechanisms of drought resistance, p.15–37. En: Paleg LG and Aspinall D (eds.) *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic, New York.
94. Jones H. (2004) What is water use efficiency? En: Bacon MA (ed). *Water use efficiency in plant biology*. Oxford: Blackwell p. 27-41.
95. Julius BT, Leach KA, Tran TM, Mertz RA, Braun DM. Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries. *Plant Cell Physiol.* 2017 Sep 1;58(9):1442-1460. doi: 10.1093/pcp/pcx090.
96. Kaler AS, Ray JD, Schapaugh WT, King CA, Purcell LC. Genome-wide association mapping of canopy wilting in diverse soybean genotypes. *Theor Appl Genet.* 2017 Oct;130(10):2203-2217. doi: 10.1007/s00122-017-2951-z.
97. Kanchiswamy CN. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. *Plant Cell Rep.* 2016 Jul;35(7):1469-74. doi: 10.1007/s00299-016-1982-2
98. Klionsky DJ, Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:1-32. doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.1.

Referencias

99. Kim J, Lee H, Lee HN, Kim SH, Shin KD, Chung T. Autophagy-related proteins are required for degradation of peroxisomes in Arabidopsis hypocotyls during seedling growth. *Plant Cell*. 2013 Dec;25(12):4956-66. doi: 10.1105/tpc.113.117960.
100. Kim JY, Mahé A, Brangeon J, Prioul JL. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiol*. 2000 Sep;124(1):71-84. doi: 10.1104/pp.124.1.71
101. Kim GB, Nam YW. Isolation and Characterization of *Medicago truncatula* U6 Promoters for the Construction of Small Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing Vectors. *Plant Mol Biol Rep* (2013) 31, 581–593. doi: 10.1007/s11105-012-0528-1.
102. Kim GB, Bae JH, An CS, Nam YW. Single or Multiple Gene Silencing Directed by U6 Promoter-Based shRNA Vectors Facilitates Efficient Functional Genome Analysis in *Medicago truncatula*. *Plant Mol Biol Rep* (2013) 31, 963–977. doi: 10.1007/s11105-013-0562-7.
103. Klionsky DJ, Schulman BA. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2014 Apr;21(4):336-45. doi: 10.1038/nsmb.2787.
104. Knoblauch M, Knoblauch J, Mullendore DL, Savage JA, Babst BA, Beecher SD, Dodgen AC, Jensen KH, Holbrook NM. Testing the Münch hypothesis of long distance phloem transport in plants. *Elife*. (2016) 5:e15341, doi: 10.7554/eLife.15341.
105. Kohzuma K, Sato Y, Ito H, Okuzaki A, Watanabe M, Kobayashi H, Nakano M, Yamatani H, Masuda Y, Nagashima Y, Fukuoka H, Yamada T, Kanazawa A, Kitamura K, Tabei Y, Ikeuchi M, Sakamoto W, Tanaka A, Kusaba M. The Non-Mendelian Green Cotyledon Gene in Soybean Encodes a Small Subunit of Photosystem II. *Plant Physiol*. 2017 Apr;173(4):2138-2147. doi: 10.1104/pp.16.01589.
106. Kuai B, Chen J, Hörtensteiner S. The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *J Exp Bot* (2018) 69: 751-767. doi: 10.1093/jxb/erx322
107. Kühn C, Hajirezaei MR, Fernie AR, Roessner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer WB. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol*. 2003 Jan;131(1):102-13. doi: 10.1104/pp.011676.

Referencias

108. Kunert K, Vorster BJ. In search for drought-tolerant soybean: is the slow-wilting phenotype more than just a curiosity? *J Exp Bot.* 2020 Jan 7;71(2):457-460. doi: 10.1093/jxb/erz235.
109. Kuppu S, Mishra N, Hu R, Sun L, Zhu X, Shen G, Blumwald E, Payton P, Zhang H. Water-deficit inducible expression of a cytokinin biosynthetic gene IPT improves drought tolerance in cotton. *PLoS One.* 2013 May 10;8(5):e64190. doi: 10.1371/journal.pone.0064190.
110. Kurepa J, Shull TE, Smalle JA. Antagonistic activity of auxin and cytokinin in shoot and root organs. *Plant Direct.* 2019 Feb 25;3(2):e00121. doi: 10.1002/pld3.121.
111. Kurepa J, Smalle JA. Auxin/Cytokinin Antagonistic Control of the Shoot/Root Growth Ratio and Its Relevance for Adaptation to Drought and Nutrient Deficiency Stresses. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 9;23(4):1933. doi: 10.3390/ijms23041933.
112. Kusaba M, Tanaka A, Tanaka R. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynth Res.* 2013 Nov;117(1-3):221-34. doi: 10.1007/s11120-013-9862-x.
113. Kuzma J. Policy: Reboot the debate on genetic engineering. *Nature.* 2016 Mar 10;531(7593):165-7. doi: 10.1038/531165a.
114. Lam HM, Wong P, Chan HK, Yam KM, Chen L, Chow CM, Coruzzi GM. Overexpression of the ASN1 gene enhances nitrogen status in seeds of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2003 Jun;132(2):926-35. doi: 10.1104/pp.103.020123.
115. Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S. Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot.* 2014 Mar;65(3):799-807. doi: 10.1093/jxb/ert474.
116. Lee S, Seo PJ, Lee HJ, Park CM. A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant J.* 2012 Jun;70(5):831-44. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04932.x.
117. Leggewie G, Kolbe A, Lemoine R, Roessner U, Lytovchenko A, Zuther E, Kehr J, Frommer WB, Riesmeier JW, Willmitzer L, Fernie AR. Overexpression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. *Planta* (2003) 217(1):158-167. <https://www.jstor.org/stable/23387813>

Referencias

118. Lei Y, Lu L, Liu HY, Li S, Xing F, Chen LL. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*. 2014 Sep;7(9):1494-1496. doi: 10.1093/mp/ssu044.
119. Li F, Chung T, Pennington JG, Federico ML, Kaeppler HF, Kaeppler SM, Otegui MS, Vierstra RD. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant Cell*. 2015 May;27(5):1389-408. doi: 10.1105/tpc.15.00158.
120. Li F, Chung T, Vierstra RD. AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2014 Feb;26(2):788-807. doi: 10.1105/tpc.113.120014.
121. Li F, Vierstra RD. Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci*. 2012 Sep;17(9):526-37. doi: 10.1016/j.tplants.2012.05.006.
122. Li S, Cong Y, Liu Y, Wang T, Shuai Q, Chen N, Gai J, Li Y. Optimization of Agrobacterium-Mediated Transformation in Soybean. *Front Plant Sci*. 2017 Feb 24;8:246. doi: 10.3389/fpls.2017.00246.
123. Li Y, Zhang J, Zhang J, Hao L, Hua J, Duan L, Zhang M, Li Z. Expression of an Arabidopsis molybdenum cofactor sulphurase gene in soybean enhances drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant Biotechnol J*. 2013 Aug;11(6):747-58. doi: 10.1111/pbi.12066.
124. Li Z, Jiang L, Ma Y, Wei Z, Hong H, Liu Z, Lei J, Liu Y, Guan R, Guo Y, Jin L, Zhang L, Li Y, Ren Y, He W, Liu M, Htwe NM, Liu L, Guo B, Song J, Tan B, Liu G, Li M, Zhang X, Liu B, Shi X, Han S, Hua S, Zhou F, Yu L, Li Y, Wang S, Wang J, Chang R, Qiu L. Development and utilization of a new chemically-induced soybean library with a high mutation density. *J Integr Plant Biol*. 2017 Jan;59(1):60-74. doi: 10.1111/jipb.12505.
125. Li Z, Wu S, Chen J, Wang X, Gao J, Ren G, Kuai B. NYEs/SGRs-mediated chlorophyll degradation is critical for detoxification during seed maturation in Arabidopsis. *Plant J*. 2017 Nov;92(4):650-661. doi: 10.1111/tpj.13710.
126. Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*. 2017 Jan 18;8:14261. doi: 10.1038/ncomms14261.

Referencias

127. Lin YP, Wu MC, Charng YY. Identification of a Chlorophyll Dephytylase Involved in Chlorophyll Turnover in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2016 Dec;28(12):2974-2990. doi: 10.1105/tpc.16.00478.
128. Liu S, Zhang M, Feng F, Tian Z. Toward a "Green Revolution" for Soybean. *Mol Plant*. 2020 May 4;13(5):688-697. doi: 10.1016/j.molp.2020.03.002.
129. Liu Y, Bassham DC. TOR is a negative regulator of autophagy in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*. 2010 Jul 29;5(7):e11883. doi: 10.1371/journal.pone.0011883.
130. Liu Y, Bassham DC. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol*. 2012;63:215-37. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105441.
131. Lu MZ, Carter AM, Tegeder M. Altering ureide transport in nodulated soybean results in whole-plant adjustments of metabolism, assimilate partitioning, and sink strength. *J Plant Physiol*. 2022 Feb;269:153613. doi: 10.1016/j.jplph.2021.153613.
132. Lynch JP. Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Ann Bot*. 2013 Jul;112(2):347-57. doi: 10.1093/aob/mcs293.
133. Ma X, Liu YG. CRISPR/Cas9-Based Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Curr Protoc Mol Biol*. 2016 Jul 1;115:31.6.1-31.6.21. doi: 10.1002/cpmb.10.
134. Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu YG. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Mol Plant*. 2015 Aug;8(8):1274-84. doi: 10.1016/j.molp.2015.04.007.
135. Ma X, Xia H, Liu Y, Wei H, Zheng X, Song C, Chen L, Liu H, Luo L. Transcriptomic and metabolomic studies disclose key metabolism pathways contributing to well-maintained photosynthesis under the drought and the consequent drought-tolerance in rice. *Front Plant Sci* (2016) doi: 10.3389/fpls.2016.01886.
136. Madoka Y, Tomizawa K, Mizoi J, Nishida I, Nagano Y, Sasaki Y. Chloroplast transformation with modified accD operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in

Referencias

- seed yield in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 2002 Dec;43(12):1518-25. doi: 10.1093/pcp/pcf172.
137. Maldonado dos Santos JV, Valliyodan B, Joshi T, Khan SM, Liu Y, Wang J, Vuong TD, de Oliveira MF, Marcelino-Guimarães FC, Xu D, Nguyen HT, Abdelnoor RV. Evaluation of genetic variation among Brazilian soybean cultivars through genome resequencing. *BMC Genomics.* 2016 Feb 13;17:110. doi: 10.1186/s12864-016-2431-x.
138. Marron N, Dreyer E, Boudouresque E, Delay D, Petit JM, Delmotte FM, Brignolas F. Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo'. *Tree Physiol.* 2003 Dec;23(18):1225-35. doi: 10.1093/treephys/23.18.1225.
139. Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran LS, Nguyen HT. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiol.* 2009 Jul;50(7):1260-76. doi: 10.1093/pcp/pcp082.
140. Manavalan LP, Prince SJ, Musket TA, Chaky J, Deshmukh R, Vuong TD, Song L, Cregan PB, Nelson JC, Shannon JG, Specht JE, Nguyen HT. Identification of novel QTL governing root architectural traits in an interspecific soybean population. *PLoS One* (2015) 10(3): e0120490, doi: 10.1371/journal.pone.0120490.
141. Malnoy M, Viola R, Jung MH, Koo OJ, Kim S, Kim JS, Velasco R, Nagamangala Kanchiswamy C. DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. *Front Plant Sci.* 2016 Dec 20;7:1904. doi: 10.3389/fpls.2016.01904.
142. Marquez-Garcia B, Shaw D, Cooper JW, Karpinska B, Quain MD, Makgopa EM, Kunert K, Foyer CH. Redox markers for drought-induced nodule senescence, a process occurring after drought-induced senescence of the lowest leaves in soybean (*Glycine max*). *Ann Bot.* 2015 Sep;116(4):497-510. doi: 10.1093/aob/mcv030.
143. Marshall RS, Li F, Gemperline DC, Book AJ, Vierstra RD. Autophagic degradation of the 26S proteasome is mediated by the dual ATG8/ubiquitin receptor RPN10 in *Arabidopsis*. *Mol Cell* (2015): doi/10.1016/j.molcel.2015.04.023.
144. Martin T, Oswald O, Graham IA. *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are

Referencias

- regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiol.* 2002 Feb;128(2):472-81. doi: 10.1104/pp.010475.
145. Martínez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui MS, Guiamet JJ. 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J.* 2008 Oct;56(2):196-206. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03585.x.
146. Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot.* 2010 Jun;105(7):1141-57. doi: 10.1093/aob/mcq028.
147. Mason TG, Maskell EJ. Studies on the transport of carbohydrates in the cotton plant: II. the factors determining the rate and the direction of movement of sugars. *Ann Bot* (1928) 42(3): 571-636. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a090131.
148. Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol.* 1999 Sep;121(1):97-112. doi: 10.1104/pp.121.1.97.
149. McFadden GI, van Dooren GG. Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr Biol.* 2004 Jul 13;14(13):R514-6. doi: 10.1016/j.cub.2004.06.041.
150. Mendes GC, Reis PAB, Calil IP, Carvalho HH, Aragão FJL, Fontes EPB. GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress- and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 110(48):19627-19632. doi: 10.1073/pnas.1311729110.
151. Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J.* 2007 Dec;52(5):973-86. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03280.x.
152. Metje-Sprink J, Menz J, Modrzejewski D, Sprink T. DNA-Free Genome Editing: Past, Present and Future. *Front Plant Sci.* 2019 Jan 14;9:1957. doi: 10.3389/fpls.2018.01957.
153. Michaeli S, Honig A, Levanony H, Peled-Zehavi H, Galili G. *Arabidopsis* ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-

Referencias

- dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *Plant Cell*. 2014 Oct;26(10):4084-101. doi: 10.1105/tpc.114.129999.
154. Michno JM, Wang X, Liu J, Curtin SJ, Kono TJ, Stupar RM. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops Food*. 2015;6(4):243-52. doi: 10.1080/21645698.2015.1106063.
155. Moubayidin L, Di Mambro R, Sabatini S. Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends Plant Sci*. 2009 Oct;14(10):557-62. doi: 10.1016/j.tplants.2009.06.010.
156. Mueller-Roeber, B., Balazadeh, S. Auxin and Its Role in Plant Senescence. *J Plant Growth Regul* 33, 21–33 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9398-5>
157. Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J Exp Bot*. 2011 Mar;62(6):1715-29. doi: 10.1093/jxb/erq438.
158. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science*. 2004 Nov 5;306(5698):1037-40. doi: 10.1126/science.1103966.
159. Nakano M, Yamada T, Masuda Y, Sato Y, Kobayashi H, Ueda H, Morita R, Nishimura M, Kitamura K, Kusaba M. A green-cotyledon/stay-green mutant exemplifies the ancient whole-genome duplications in soybean. *Plant Cell Physiol*. 2014 Oct;55(10):1763-71. doi: 10.1093/pcp/pcu107.
160. Naseem M, Dandekar T. The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLoS Pathog*. 2012;8(11):e1003026. doi: 10.1371/journal.ppat.1003026.
161. Neupane A, Bulbul I, Wang Z, Lehman RM, Nafziger E, Marzano SL. Long term crop rotation effect on subsequent soybean yield explained by soil and root-associated microbiomes and soil health indicators. *Sci Rep*. 2021 Apr 28;11(1):9200. doi: 10.1038/s41598-021-88784-6.
162. Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant

Referencias

- role for photorespiration? *Ann Bot.* 2002 Jun;89 Spec No(7):841-50. doi: 10.1093/aob/mcf096.
163. Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiol.* 2014 Apr;164(4):1636-48. doi: 10.1104/pp.113.233478.
164. Noodén LD, Kahanak GM, Okatan Y. Prevention of monocarpic senescence in soybeans with auxin and cytokinin: an antidote for self-destruction. *Science.* 1979 Nov 16;206(4420):841-3. doi: 10.1126/science.206.4420.841.
165. Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Mol Plant.* 2010 Nov;3(6):973-96. doi: 10.1093/mp/ssq049.
166. Oda-Yamamizo C, Mitsuda N, Sakamoto S, Ogawa D, Ohme-Takagi M, Ohmiya A. Corrigendum: The NAC transcription factor ANAC046 is a positive regulator of chlorophyll degradation and senescence in Arabidopsis leaves. *Sci Rep.* 2016 Oct 19;6:35125. doi: 10.1038/srep35125. Erratum for: *Sci Rep.* 2016 Mar 29;6:23609.
167. Oladosu Y, Rafii MY, Abdullah N, Hussin G, Ramli A, Rahim HA, Miah G, Usman M. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2016 30:1–16. doi: 10.1080/13102818.2015.1087333
168. Olvera-Carrillo Y, Van Bel M, Van Hautegeem T, Fendrych M, Huysmans M, Simaskova M, van Durme M, Buscaill P, Rivas S, Coll NS, Coppens F, Maere S, Nowack MK. A conserved core of programmed cell death indicator genes discriminates developmentally and environmentally induced programmed cell death in plants. *Plant Physiol* 2015 169: 2684-2699. doi: 10.1104/pp.15.00769.
169. Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guamet JJ. Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *Plant J.* 2005 Mar;41(6):831-44. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02346.x.
170. Pantin F, Fanciullino AL, Massonnet C, Dauzat M, Simonneau T, Muller B. Buffering growth variations against water deficits through timely carbon usage. *Front Plant Sci* (2013) 4 (483), doi:10.3389/fpls.2013.00483.

Referencias

171. Pardo EM, Vellicce GR, Aguirrezabal L, Pereyra Irujo G, Rocha CML, García MG, Prieto Angueira S, Welin B, Sanchez J, Ledesma F, Castagnaro AP. Drought tolerance screening under controlled conditions predicts ranking of water-limited yield of field-grown soybean genotypes. *J Agron Crop Sci* 2014 201: 95-104. doi: 10.1111/jac.12106.
172. Parent B, Hachez C, Redondo E, Simonneau T, Chaumont F, Tardieu F. Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant Physiol.* 2009 Apr;149(4):2000-12. doi: 10.1104/pp.108.130682.
173. Paul MJ, Foyer CH. Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot.* 2001 Jul;52(360):1383-400. doi: 10.1093/jexbot/52.360.1383.
174. Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y. Trehalose metabolism and signaling. *Annu Rev Plant Biol.* 2008;59:417-41. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092945.
175. Pathan MS, Lee JD, Shannon JG y Nguyen HT (2007). Recent advances in breeding for drought and salt stress tolerance in soybean. En: *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds.):265-302 Springer New York.
176. Peleg Z, Reguera M, Tumimbang E, Walia H, Blumwald E. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnol J.* 2011 Sep;9(7):747-58. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00584.x.
177. Phillips AR, Suttangkakul A, Vierstra RD. The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* 2008 Mar;178(3):1339-53. doi: 10.1534/genetics.107.086199.
178. Pimenta MR, Silva PA, Mendes GC, Alves JR, Caetano HD, Machado JP, Brustolini OJ, Carpinetti PA, Melo BP, Silva JC, Rosado GL, Ferreira MF, Dal-Bianco M, Picoli EA, Aragao FJ, Ramos HJ, Fontes EP. The Stress-Induced Soybean NAC Transcription Factor GmNAC81 Plays a Positive Role in Developmentally Programmed Leaf Senescence. *Plant Cell Physiol.* 2016 May;57(5):1098-114. doi: 10.1093/pcp/pcw059. Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, de Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in

Referencias

- the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* 2005 Mar;165(3):683-701. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01285.x.
179. Poret M, Chandrasekar B, van der Hoorn RAL, Avice JC. Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape. *Plant Sci.* 2016 May;246:139-153. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.02.011.
180. Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta.* 2006 Aug;224(3):556-68. doi: 10.1007/s00425-006-0243-y.
181. Prince SJ, Song L, Qiu D, Maldonado Dos Santos JV, Chai C, Joshi T, Patil G, Valliyodan B, Vuong TD, Murphy M, Krampis K, Tucker DM, Biyashev R, Dorrance AE, Maroof MA, Xu D, Shannon JG, Nguyen HT. Genetic variants in root architecture-related genes in a *Glycine soja* accession, a potential resource to improve cultivated soybean. *BMC Genomics.* 2015 Feb 25;16(1):132. doi: 10.1186/s12864-015-1334-6.
182. Quick WP, Chaves MM, Wendler R, David M, Rodrigues ML, Passaharinho JA, Pereira JS, Adcock MD, Leegood RC, Stitt M. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell Environ* (1992) 15: 25-35. doi: 10.1111/j.1365-3040.1992.tb01455.x.
183. Ranathunge K, El-Kereamy A, Gidda S, Bi YM, Rothstein SJ. AMT1;1 transgenic rice plants with enhanced NH₄(+) permeability show superior growth and higher yield under optimal and suboptimal NH₄(+) conditions. *J Exp Bot.* 2014 Mar;65(4):965-79. doi: 10.1093/jxb/ert458.
184. Reguera M, Peleg Z, Abdel-Tawab YM, Tumimbang EB, Delatorre CA, Blumwald E. Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. *Plant Physiol.* 2013 Dec;163(4):1609-22. doi: 10.1104/pp.113.227702.
185. Ries L, Purcell L, Carter T, Edwards JT, King CA. Physiological Traits Contributing to Differential Canopy Wilting in Soybean under Drought. *Crop Sci.* 2012 52. 272. doi: 10.2135/cropsci2011.05.0278.

Referencias

186. Rivas-San Vicente M, Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot.* 2011 Jun;62(10):3321-38. doi: 10.1093/jxb/err031.
187. Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald E. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 4;104(49):19631-6. doi: 10.1073/pnas.0709453104.
188. Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E. Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiol.* 2009 Jul;150(3):1530-40. doi: 10.1104/pp.109.139378.
189. Rivero RM, Gimeno J, Van Deynze A, Walia H, Blumwald E. Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing PSARK::IPT prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought. *Plant Cell Physiol.* 2010 Nov;51(11):1929-41. doi: 10.1093/pcp/pcq143.
190. Rodrigues J, Inzé D, Nelissen H, Saibo NJM. Source-Sink Regulation in Crops under Water Deficit. *Trends Plant Sci.* 2019 Jul;24(7):652-663. doi: 10.1016/j.tplants.2019.04.005.
191. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.* 2014 Jan 23;53(2):167-78. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.014.
192. Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol.* 2006;57:675-709. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441.
193. Rossato L, Lainé P, Ourry A. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *J Exp Bot.* 2001 Aug;52(361):1655-63.
194. Sade N, Del Mar Rubio-Wilhelmi M, Umnajkitikorn K, Blumwald E. Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *J Exp Bot.* 2018a Feb 12;69(4):845-853. doi: 10.1093/jxb/erx235.
195. Sade N, Umnajkitikorn K, Rubio Wilhelmi MDM, Wright M, Wang S, Blumwald E. Delaying chloroplast turnover increases water-deficit

Referencias

- stress tolerance through the enhancement of nitrogen assimilation in rice. *J Exp Bot.* 2018 Feb 12;69(4):867-878. doi: 10.1093/jxb/erx247.
196. Sadok W, Sinclair TR Genetic variability of transpiration response to vapor pressure deficit among soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars. *Crop Sci* 2009 49:955–960. doi: 10.2135/cropsci2008.09.0560.
197. Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonossoff GP. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J.* 2009 Sep;7(7):682-93. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00434.x.
198. Santiago JP, Tegeder M. Connecting Source with Sink: The Role of Arabidopsis AAP8 in Phloem Loading of Amino Acids. *Plant Physiol.* 2016 May;171(1):508-21. doi: 10.1104/pp.16.00244.
199. Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell.* 2015 Jan;27(1):44-63. doi: 10.1105/tpc.114.133595.
200. Schepetilnikov M, Ryabova LA. Recent Discoveries on the Role of TOR (Target of Rapamycin) Signaling in Translation in Plants. *Plant Physiol.* 2018 Feb;176(2):1095-1105. doi: 10.1104/pp.17.01243.
201. Schenk N, Schelbert S, Kanwischer M, Goldschmidt EE, Dörmann P, Hörtensteiner S. The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 2007 Nov 27;581(28):5517-25. doi: 10.1016/j.febslet.2007.10.060.
202. Selvaraj MG, Ishizaki T, Valencia M, Ogawa S, Dedicova B, Ogata T, Yoshiwara K, Maruyama K, Kusano M, Saito K, Takahashi F, Shinozaki K, Nakashima K, Ishitani M. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* galactinol synthase gene improves drought tolerance in transgenic rice and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnol J.* 2017 Nov;15(11):1465-1477. doi: 10.1111/pbi.12731.
203. Shi J, Habben JE, Archibald RL, Drummond BJ, Chamberlin MA, Williams RW, Lafitte HR, Weers BP. Overexpression of ARGOS Genes Modifies Plant Sensitivity to Ethylene, Leading to Improved Drought Tolerance in Both *Arabidopsis* and Maize. *Plant Physiol.* 2015 Sep;169(1):266-82. doi: 10.1104/pp.15.00780.
204. Shi W, Cheng J, Wen X, Wang J, Shi G, Yao J, Hou L, Sun Q, Xiang P, Yuan X, Dong S, Guo P, Guo J. Transcriptomic studies reveal a

Referencias

- keymetabolic pathway contributing to a well-maintained photosynthetic system under drought stress in foxtail millet (*Setaria italica* L.). PeerJ 6:e4752, doi: 10.7717/peerj.4752.
205. Shibata M, Oikawa K, Yoshimoto K, Kondo M, Mano S, Yamada K, Hayashi M, Sakamoto W, Ohsumi Y, Nishimura M. Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in Arabidopsis. Plant Cell. 2013 Dec;25(12):4967-83. doi: 10.1105/tpc.113.116947.
206. Sloane RJ, Patterson RP, Carter TE Jr. Field drought tolerance of a soybean plant introduction. Crop Sci 1990 30:118–123. doi: 10.2135/cropsci1990.0011183X003000010027x.
207. Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. PLoS One. 2015 Apr 24;10(4):e0124633. doi: 10.1371/journal.pone.0124633. Erratum in: PLoS One. 2017 Apr 20;12(4):e0176619.
208. Stepanova AN, Alonso JM. (2005). Ethylene signaling and response pathway: A unique signaling cascade with a multitude of inputs and outputs. Physiol. Plant. 123, 195–206. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00447.x
209. Stepanova AN, Hoyt JM, Hamilton AA, Alonso JM. A Link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. Plant Cell. 2005 Aug;17(8):2230-42. doi: 10.1105/tpc.105.033365.
210. Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Dolezal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell. 2008 Apr 4;133(1):177-91. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.047.
211. Stepanova AN, Alonso JM. From Ethylene-Auxin Interactions to Auxin Biosynthesis and Signal Integration. Plant Cell. 2019 Jul;31(7):1393-1394. doi: 10.1105/tpc.19.00339.
212. Subburaj S, Chung SJ, Lee C, Ryu SM, Kim DH, Kim JS, Bae S, Lee GJ. Site-directed mutagenesis in *Petunia x hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. Plant Cell Rep. 2016 Jul;35(7):1535-44. doi: 10.1007/s00299-016-1937-7.
213. Svenning S, Lamark T, Krause K, Johansen T. Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian

Referencias

- autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy*. 2011 Sep;7(9):993-1010. doi: 10.4161/auto.7.9.16389.
214. Tajima T, Yamaguchi A, Matsushima S, Satoh M, Hayasaka S, Yoshimatsu K, Shioi Y. Biochemical and molecular characterization of senescence-related cysteine protease-cystatin complex from spinach leaf. *Physiol Plant*. 2011 Feb;141(2):97-116. doi: 10.1111/j.1399-3054.2010.01425.x.
215. Tardieu F. Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *J Exp Bot*. 2012 Jan;63(1):25-31. doi: 10.1093/jxb/err269.
216. Tardieu F. Too many partners in root-shoot signals. Does hydraulics qualify as the only signal that feeds back over time for reliable stomatal control? *New Phytol*. 2016 Dec;212(4):802-804. doi: 10.1111/nph.14292.
217. Tardieu F, Simonneau T, Parent B. Modelling the coordination of the controls of stomatal aperture, transpiration, leaf growth, and abscisic acid: update and extension of the Tardieu-Davies model. *J Exp Bot*. 2015 Apr;66(8):2227-37. doi: 10.1093/jxb/erv039.
218. Tardieu F, Simonneau T, Muller B. The Physiological Basis of Drought Tolerance in Crop Plants: A Scenario-Dependent Probabilistic Approach. *Annu Rev Plant Biol*. 2018 Apr 29;69:733-759. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040218.
219. Tegeder M, Masclaux-Daubresse C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytol*. 2018 Jan;217(1):35-53. doi: 10.1111/nph.14876.
220. Teulat B, Borries C, This D. New QTLs identified for plant water status, water-soluble carbohydrate and osmotic adjustment in a barley population grown in a growth-chamber under two water regimes. *Theoret and Appl Genet* 2001 103: 161-170. doi: 10.1007/s001220000503.
221. Thomas H, Howarth CJ. Five ways to stay green. *J Exp Bot*. 2000 Feb;51 Spec No:329-37. doi: 10.1093/jexbot/51.suppl_1.329.
222. Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD. Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol*. 2005 Aug;138(4):2097-110. doi: 10.1104/pp.105.060673.

Referencias

223. Thomsen HC, Eriksson D, Møller IS, Schjoerring JK. Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency? *Trends Plant Sci.* 2014 Oct;19(10):656-63. doi: 10.1016/j.tplants.2014.06.002.
224. Timpa JD, Burke JJ, Quisenberry JE, Wendt CW. Effects of water stress on the organic Acid and carbohydrate compositions of cotton plants. *Plant Physiol.* 1986 Nov;82(3):724-8. doi: 10.1104/pp.82.3.724.
225. Todaka D, Zhao Y, Yoshida T, Kudo M, Kidokoro S, Mizoi J, Kodaira K-S, Takebayashi Y, Kojima M, Sakakibara H, Toyooka K, Sato M, Fernie AR, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *Plant J* (2017) 90(1): 61-78. doi: 10.1111/tpj.13468.
226. Tsuda M, Kaga A, Anai T, Shimizu T, Sayama T, Takagi K, Machita K, Watanabe S, Nishimura M, Yamada N, Mori S, Sasaki H, Kanamori H, Katayose Y, Ishimoto M. Construction of a high-density mutant library in soybean and development of a mutant retrieval method using amplicon sequencing. *BMC Genomics.* 2015 Nov 26;16:1014. doi: 10.1186/s12864-015-2079-y.
227. Turnbull C, Lillemo M, Hvoslef-Eide TAK. Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom - A Review. *Front Plant Sci.* 2021 Feb 24;12:630396. doi: 10.3389/fpls.2021.630396.
228. Turner N, Begg J, Tonnet M. Osmotic adjustment of sorghum and sunflower crops in response to water deficits and its influence on the water potential at which stomata close. *Func Plant Biol* (1978) 5: 597–608.
229. Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, Rane J, Ishitani M, Hara N, Kitomi Y, Inukai Y, Ono K, Kanno N, Inoue H, Takehisa H, Motoyama R, Nagamura Y, Wu J, Matsumoto T, Takai T, Okuno K, Yano M. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nat Genet.* 2013 Sep;45(9):1097-102. doi: 10.1038/ng.2725.
230. Van de Velde W, Guerra JC, De Keyser A, De Rycke R, Rombauts S, Maunoury N, Mergaert P, Kondorosi E, Holsters M, Goormachtig S. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):711-20. doi: 10.1104/pp.106.078691.

Referencias

231. Vanhee C, Zapotoczny G, Masquelier D, Ghislain M, Batoko H. The Arabidopsis multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *Plant Cell* 2011 23: 785-805. doi:10.1105/tpc.110.081570.
232. Visentin I, Vitali M, Ferrero M, Zhang Y, Ruyter-Spira C, Novák O, Strnad M, Lovisolo C, Schubert A, Cardinale F. Low levels of strigolactones in roots as a component of the systemic signal of drought stress in tomato. *New Phytol.* 2016 Dec;212(4):954-963. doi: 10.1111/nph.14190.
233. Wang B, Li Z, Ran Q, Li P, Peng Z, Zhang J. ZmNF-YB16 overexpression improves drought resistance and yield by enhancing photosynthesis and the antioxidant capacity of maize plants. *Front Plant Sci* (2018) 9:709, doi: 10.3389/fpls.2018.00709.
234. Wang C, Dai S, Zhang ZL, Lao W, Wang R, Meng X, Zhou X. Ethylene and salicylic acid synergistically accelerate leaf senescence in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol.* 2021 May;63(5):828-833. doi: 10.1111/jipb.13075.
235. Wang C, Gao LE, Li RZ, Wang YE, Liu YY, Zhang X, Xie H. High-throughput sequencing reveals the molecular mechanisms determining the stay-green characteristic in soybeans. *J Biosci.* 2020;45:103.
236. Wang F, Yoshida H, Matsuoka M. Making the 'Green Revolution' Truly Green: Improving Crop Nitrogen Use Efficiency. *Plant Cell Physiol.* 2021 Sep 30;62(6):942-947. doi: 10.1093/pcp/pcab051.
237. Wang L, Liu Y, Feng S, Yang J, Li D, Zhang J. Roles of plasmalemma aquaporin gene StPIP1 in enhancing drought tolerance in potato. *Front Plant Sci* (2017) 8, 616, doi: 10.3389/fpls.2017.00616.
238. Wang S, Blumwald E. Stress-induced chloroplast degradation in Arabidopsis is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell.* 2014 Dec;26(12):4875-88. doi: 10.1105/tpc.114.133116.
239. Wang W, Xu M, Wang G, Galili G. Autophagy: an important biological process that protects plants from stressful environments. *Front Plant Sci* (2017) 7, doi: 10.3389/fpls.2016.02030.

Referencias

240. Wang Y, Yu B, Zhao J, Guo J, Li Y, Han S, Huang L, Du Y, Hong Y, Tang D, Liu Y. Autophagy contributes to leaf starch degradation. *Plant Cell*. 2013 Apr;25(4):1383-99. doi: 10.1105/tpc.112.108993.
241. Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*. 2015 Nov;33(11):1162-4. doi: 10.1038/nbt.3389.
242. Wu A, Allu AD, Garapati P, Siddiqui H, Dortay H, Zanol MI, Asensi-Fabado MA, Munné-Bosch S, Antonio C, Tohge T, Fernie AR, Kaufmann K, Xue GP, Mueller-Roeber B, Balazadeh S. JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2012 Feb;24(2):482-506. doi: 10.1105/tpc.111.090894.
243. Wurzinger B, Nukarinen E, Nägele T, Weckwerth W, Teige M. The SnRK1 Kinase as Central Mediator of Energy Signaling between Different Organelles. *Plant Physiol*. 2018 Feb;176(2):1085-1094. doi: 10.1104/pp.17.01404.
244. Xie Q, Michaeli S, Peled-Zehavi H, Galili G. Chloroplast degradation: one organelle, multiple degradation pathways. *Trends Plant Sci*. 2015 May;20(5):264-265. doi: 10.1016/j.tplants.2015.03.013.
245. Xu F, Meng T, Li P, Yu Y, Cui Y, Wang Y, Gong Q, Wang NN. A soybean dual-specificity kinase, GmSARK, and its Arabidopsis homolog, AtSARK, regulate leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene. *Plant Physiol*. 2011 Dec;157(4):2131-53. doi: 10.1104/pp.111.182899.
246. Yang SD, Seo PJ, Yoon HK, Park CM. The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. *Plant Cell*. 2011 Jun;23(6):2155-68. doi: 10.1105/tpc.111.084913.
247. Ye H, Song L, Schapaugh WT, Ali ML, Sinclair TR, Riar MK, Raymond RN, Li Y, Vuong T, Valliyodan B, Pizolato Neto A, Klepadlo M, Song Q, Shannon JG, Chen P, Nguyen HT. The importance of slow canopy wilting in drought tolerance in soybean. *J Exp Bot*. 2020 Jan 7;71(2):642-652. doi: 10.1093/jxb/erz150.
248. Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2014 Oct;21:133-139. doi: 10.1016/j.pbi.2014.07.009.

Referencias

249. Yu L, Chen X, Wang Z, Wang S, Wang Y, Zhu Q, Li S, Xiang C. Arabidopsis enhanced drought tolerance1/HOMEODOMAIN GLABROUS11 confers drought tolerance in transgenic rice without yield penalty. *Plant Physiol.* 2013 Jul;162(3):1378-91. doi: 10.1104/pp.113.217596.
250. Yu LH, Wu SJ, Peng YS, Liu RN, Chen X, Zhao P, Xu P, Zhu JB, Jiao GL, Pei Y, Xiang CB. Arabidopsis EDT1/HDG11 improves drought and salt tolerance in cotton and poplar and increases cotton yield in the field. *Plant Biotechnol J.* 2016 Jan;14(1):72-84. doi: 10.1111/pbi.12358.
251. Zhang K, Gan SS. An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.* 2012 Feb;158(2):961-9. doi: 10.1104/pp.111.190876.
252. Zhang Y, Liang Z, Zong Y, Wang Y, Liu J, Chen K, Qiu JL, Gao C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun.* 2016 Aug 25;7:12617. doi: 10.1038/ncomms12617.
253. Zheng, G. Fan C, Di S, Wang X, Xiang C, Pang Y. Over-expression of Arabidopsis EDT1 gene confers drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Front. Plant Sci* (2017) 8, 2125, doi: 10.3389/fpls.2017.02125.
254. Zhou J, Wang J, Cheng Y, Chi YJ, Fan B, Yu JQ, Chen Z. NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003196. doi: 10.1371/journal.pgen.1003196.
255. Zhou Z, Jiang Y, Wang Z, Gou Z, Lyu J, Li W, Yu Y, Shu L, Zhao Y, Ma Y, Fang C, Shen Y, Liu T, Li C, Li Q, Wu M, Wang M, Wu Y, Dong Y, Wan W, Wang X, Ding Z, Gao Y, Xiang H, Zhu B, Lee SH, Wang W, Tian Z. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. *Nat Biotechnol.* 2015 Apr;33(4):408-14. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2016 Apr;34(4):441.
256. Zientara-Rytter K, Lukomska J, Moniuszko G, Gwozdecki R, Surowiecki P, Lewandowska M, Liszewska F, Wawrzyńska A, Sirko A. Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors. *Autophagy.* 2011 Oct;7(10):1145-58. doi: 10.4161/auto.7.10.16617.