Estudio de una aminotransferasa de soja con potencial aplicación biotecnológica

Maestría en Biotecnología, 2024
Laboratorio de Biología Molecular Vegetal

Catalina Barbot

Orientadoras: Dra. Sabina Vidal
y Dra. Alexandra Castro



En primera instancia me gustaría agradecer a Sabina, por haberme abierto las puertas al laboratorio, incluirme en su equipo de investigación, y por haberme guiado durante estos años. También por su disponibilidad y apertura para intercambiar conocimiento y experiencias desde lo académico y personal.

Un gran agradecimiento a Alexandra, por haberme acompañado en el trabajo de mesada, enseñarme las dinámicas de laboratorio, guiar los experimentos y aconsejarme caminos a seguir después de cada resultado negativo, siempre con buena onda y optimismo.

Un especial agradecimiento a Luciana, por ser también una referente en el laboratorio, siempre dispuesta a dar una mano o unas palabras de aliento.

A mis compañeras contemporáneas de maestría, Claudia y Pía, por estar codo a codo en la mesada, por las charlas y tiempo compartido.

A cada integrante del laboratorio de BMV, por ocupar un lugar único e inigualable en las dinámicas del laboratorio. Gracias por su buena onda, su disposición para ayudar y tirar piques para resolver inconvenientes. Gracias por el apoyo académico y emocional, por compartir risas, palabras de desesperación y desaliento, más risas y saberes.

Gracias a mis seres queridos, por ser parte de la trama de la vida, por ser sostén y compañeros de camino. Agradecer a todos aquellos que directa o indirectamente han estado al firme acompañando este proceso.

También me gustaría agradecer a Martha, Manuel y Santiago, por aceptar ser parte del tribunal, y tomarse el tiempo de leer y evaluar esta tesis; y a Facundo por su colaboración en el proyecto para realizar las medidas de aminoácidos.

Por último agradecer a las agencias financiadoras que hicieron posible el desarrollo de este trabajo:

A CSIC por financiar el proyecto de inicio a la investigación titulado "Estudio de una aminotransferasa de soja con potencial aplicación biotecnológica" (C218 _ FINANCIACIÓN: 347), así como el proyecto CSIC de grupos "Desarrollo de herramientas basadas en ingeniería genética de precisión para contribuir al mejoramiento genético de las plantas" (Grupo CSIC 1492).

A la ANII por financiar el proyecto colaborativo con la Universidad de Seúl titulado "Ingeniería del metabolismo de aminoácidos para el incremento de la tolerancia a sequía en soja" (FICUY_1_2020_1_164612).

A la CAP por financiarme una Beca de Maestría y Beca de Finalización de Maestría, sin la cual no hubiera sido posible este trabajo.

Índice

Abreviaturas **4**
Resumen **6**
Introducción **6**
Importancia y desafíos del cultivo de soja 6
Respuestas generales al estrés en plantas 7
Acumulación de aminoácidos 11
Acumulación de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) 13
Aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada (BCATs) 18
Expresión de enzimas BCAT y tolerancia al estrés en plantas 19
Antecedentes 20
Hipótesis **23**
Objetivos **23**
Materiales y métodos **23**
1. Material vegetal y condiciones de crecimiento 23
1.1. *Glycine max* (soja) 23
1.2. *Arabidopsis thaliana* 24
2. Bacterias y condiciones de crecimiento 24
2.1. *Escherichia coli* 24
2.2. *Agrobacterium tumefaciens* 25
3. Identificación de genes con homología a *OsDIAT* 25
3.1. Análisis filogenético 25
3.2. Predicción de localización subcelular 25
3.3. Análisis de expresión de los genes con homología a *OsDIAT* 25
3.4. Predicción de elementos en cis en los promotores 27
4. Generación de construcciones conteniendo el promotor de *GmDIAT* 27
5. Generación de vectores de expresión del gen *GmDIAT* 27
5.1. Amplificación de la región codificante de *GmDIAT* 27
5.2. Clonado de la región codificante de *GmDIAT* en vector pENTR2B 28
5.3. Clonado en vectores de destino mediante recombinación LR de Gateway 28
6. Generación de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas sobre-expresantes de *GmDIAT* 29
6.1. Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión floral 29
6.2. Genotipado de las líneas transgénicas 30
7. Expresión de las líneas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* 30
8. Cuantificación de BCAAs en las líneas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* 31
9. Localización subcelular de GmDIAT 31
10. Fenotipado de las líneas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* 32
10.1. Ensayos de germinación *in vitro* 32
10.2. Ensayos de crecimiento *in vitro* 32
10.3. Ensayos de déficit hídrico en tierra 33
11. Expresión de *TOR* en *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* 34

Resultados **35**
Identificación de genes ortólogos de *OsDIAT* presentes en el genoma de soja 35
1. Búsqueda de proteínas de alta homología a OsDIAT 35
2. Expresión de los genes durante el desarrollo y en condiciones de estrés 37
3. Prediccion de elementos en *cis* en los promotores 41
Generación de plantas de *Arabidopsis* transgénicas sobre-expresantes del gen *GmDIAT*. 44
Localización subcelular de GmDIAT 46
Cuantificación de BCAAs en plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* 48
Fenotipado de plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* en condiciones de estrés 49
1. Ensayos de germinación *in vitro* 49
2. Ensayos de crecimiento *in vitro* 50
3. Ensayos de déficit hídrico en tierra 52
Expresión de *TOR* en plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* 62
Discusión **62**
Familia de genes BCAT y DIAT-like 63
Efectos de la sobre-expresión de genes DIAT-like en especies vegetales 68
Rol de los BCAAs en plantas expuestas a déficit hídrico 71
Conclusiones y perspectivas **76**
Bibliografía **79**
Anexo **94**
Cebadores utilizados 94
Vectores utilizados para la generación de construcciones 95

Abreviaturas

3MOB: 3-metil-2oxobutanoato

3MOP: 3-metil-2-oxopentanoato

4MOP: 4-metil-2-oxopentanoato

AAO: Aldehído oxidasa

ABA: Ácido absísico

AHAS: Acetohidroxiácido sintasa

BCAAs: Aminoácidos de cadena ramificada

BCAT: Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada

BCKD: α-cetoácido de cadena ramificada dehidrogenasa

CAT: Catalasa

DAB: Diaminobencidina

DHAD: Dihidroxiácido dehidratasa

ECH: Enoil-CoA dehidratasa

ETF: Flavoproteína de transferencia de electrones

ETFQO: Flavoproteína de transferencia de electrones ubiquinona oxidoreductasa

GDT: Glutatión S-transferasa

GmDIAT: *Glycine max Drought Induced Aminotransferase*

Ile: Isoleucina

IPMDH: Isopropilmalato dehidrogenasa

IPMI: Isopropilmalato isomerasa

IPMS: Isopropilmalato sintasa

IPP: Isopropilmalato difosfato

I**VD:** Isovaleril-CoA deshidrogenasa

JA: Jasmonato

KAR: Cetoácido reductoisomerasa

LEA: *Late Embryogenesis Abundant*

Leu: Leucina

MCCase: *3*-metilcrotonil-CoA carboxilasa

MEP: Metileritritol fosfato

Met: Metionina

MTOB: 4-metiltriol-2-oxobutanoato

MTOP: 4-metiltriol-2-oxopentanoato

NBT: Nitroazul de tetrazolio

NCED: 9-cisepoxicarotenoide dioxigenasa

OE: Líneas sobre-expresantes

OsDIAT: *Oryza sativa Drought Induced Aminotransferase*

P5C: Pirrolin-5-carboxilasa

P5CDH: Pirrolin-5-carboxilasa dehidrogenasa

P5CR: Pirrolin-5-carboxilasa reductasa

P5CS: Pirrolin-5-carboxilasa sintasa

PDH: Prolina deshidrogenasa

POD: Peroxidasa

Pro: Prolina

PAM: *Pulse Amplitude Modulation*

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SAM: S-adenosilmetionina

SDR: Alcohol de cadena corta deshidrogenasa/reductasa

SOD: Superóxido dismutasa

TD: Treonina desaminasa

TF: Factor de transcripción

TOR: *Target of Rapamycin*

Val: Valina

WC: contenido de agua

WT: *Wild type*

ZEP: Zeaxantina epoxidasa

Resumen

La soja es uno de los cultivos más importantes a nivel nacional, tanto por la superficie de siembra como por su relevancia en el mercado internacional. Las condiciones bióticas y abióticas del ambiente determinan en gran medida la producción y el rendimiento del cultivo de soja, siendo el déficit hídrico el factor que genera más pérdidas en el rendimiento. Las plantas presentan diversos mecanismos para hacerle frente a las condiciones de sequía, dentro de los cuales se encuentra la reprogramación metabólica. La acumulación de aminoácidos específicos, como la prolina y los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) es una respuesta frecuente al estrés en las plantas. Ensayos anteriores del laboratorio determinaron que distintos genotipos de soja acumulan BCAAs en condiciones de déficit hídrico, y que el genotipo más tolerante a esas condiciones de estrés alcanza niveles más elevados de BCAAs que los otros dos genotipos analizados. La acumulación de BCAAs depende de enzimas que participan en sus síntesis y degradación, así como de la degradación de proteínas. Se ha propuesto que la regulación transcripcional de las enzimas que participan en el metabolismo de BCAAs sería de especial relevancia en condiciones de estrés hídrico. En este trabajo se identificó un gen de soja (*GmDIAT*) con alta similitud de secuencia con *OsDIAT,* el cual fue identificado en arroz como un gen inducido por sequía que codifica para una aminotransferasa de BCAAs. La sobreexpresión de *OsDIAT* en arroz aumenta los niveles de BCAAs y la tolerancia al déficit hídrico en esta planta. En el presente trabajo se demostró que *GmDIAT* se induce en condiciones de déficit hídrico, y su expresión heteróloga en *Arabidopsis* promueve la acumulación de BCAAs. Los resultados también indican que la expresión de *GmDIAT* en *Arabidopsis* promueve la germinación y crecimiento de las plantas en condiciones de estrés osmótico y salino, y aumenta el rendimiento de las plantas expuestas a condiciones de déficit hídrico. En conjunto estos resultados sugieren que *GmDIAT* es un buen candidato para incrementar la tolerancia de soja frente a condiciones de déficit hídrico.

Introducción

Importancia y desafíos del cultivo de soja

La soja (*Glycine max*) es una leguminosa originaria del sudeste asiático obtenida a partir de la domesticación de la especie salvaje *Glycine soja*. En Occidente el cultivo y el consumo de soja y sus productos se expandió enormemente en el siglo XX, y hoy en día es uno de los granos cultivados de mayor importancia a nivel mundial. El 80% de la producción mundial es generada por tan sólo tres países: Estados Unidos, Brasil y Argentina (USDA, 2024). La soja es utilizada principalmente para alimentación, dada la alta calidad nutricional y el gran contenido de proteína y aceites que contiene su grano. La mayor parte de la producción tiene como destino la alimentación animal, especialmente para aves y cerdos. También se utiliza para consumo humano, así como para la producción de otros productos como el biodiesel. Además de tener una gran importancia a nivel mundial, la soja es uno de los cultivos más importantes en Uruguay, tanto en superficie de siembra, como por su relevancia entre los productos de exportación. Representa un 54% del área de cultivo destinado a grano, y fue en 2022 el segundo producto que generó más ingresos por exportaciones, luego de la carne bovina, representando un 14% de las ganancias con 2 mil millones de dólares aproximadamente

(Uruguay XXI, 2022).

Las condiciones bióticas y abióticas del ambiente determinan en gran medida la producción y el rendimiento del cultivo de soja. Dado que la principal fuente de agua de los cultivos está dada por las precipitaciones, la productividad de los mismos se ve frecuentemente afectada por sequías estacionales, limitando los rendimientos y reduciendo la calidad del grano. En Uruguay, se ha reportado que hasta el 60% de la variabilidad de rendimiento del cultivo de soja depende de la disponibilidad hídrica (INIA, 2012). A modo de ejemplo, el verano de 2022 fue el más seco en los últimos 42 años en la historia del país. Se sembraron 1 millón de hectáreas, de las cuales se perdió un 25% que no fue cosechado, generando un rendimiento de 641 kg/ha, un 25% respecto a la zafra anterior y el más bajo desde 1998 (MGAP, 2022). En un contexto de cambio climático, se espera que estos eventos de condiciones extremas como la sequía sean cada vez más frecuentes, razón por la cual resulta de gran interés estudiar los mecanismos que subyacen a las respuestas de las plantas al estrés hídrico.

Respuestas generales al estrés en plantas

La capacidad de resistencia de las plantas a las condiciones de estrés hídrico, y al estrés en general, está dada por la habilidad de las plantas de sortear las condiciones adversas, así como de generar mecanismos que les permitan sobrevivir, recuperarse y reproducirse.

Las plantas presentan tres mecanismos principales para hacer frente a las condiciones de estrés hídrico: escape, elusión y tolerancia. El mecanismo de escape se refiere a la capacidad de las plantas para evitar el impacto del estrés ambiental, al completar su ciclo de vida antes de que se produzca el estrés severo. Es un mecanismo producto de la evolución de las especies, y puede observarse en especies anuales o plantas con ciclos de vida cortos. Las plantas que emplean el mecanismo de escape suelen germinar, crecer, florecer y reproducirse durante la temporada en que la disponibilidad de agua es más alta, y la temperaturas son moderadas, y concluyen su ciclo de vida antes de que la sequía se convierta en un factor limitante. Esta estrategia es particularmente eficiente en ambientes donde la sequía, o los cambios de temperatura son estacionales o predecibles (Manavalan *et al.*, 2009; Mitra, 2001). Por otro lado, el mecanismo de elusión está dado por la capacidad de las plantas de mantener su potencial hídrico a pesar de las condiciones de estrés. Para ello las plantas intentan evitar la pérdida de agua por transpiración, ya sea a través del cierre rápido de los estomas, el enrollamiento de las hojas o la acumulación de sustancias cerosas en las mismas (Tardieu, 2013; Islam *et al.*,2009; Zhang *et al.*,2005); así como aumentar su capacidad de absorber agua a través del crecimiento de las raíces hacia capas de tierra más profundas y aumentando el desarrollo de sus raíces laterales (Tardieu, 2013). Los mecanismos de elusión le permiten a las plantas sobrellevar eventos de estrés hídrico moderado, evitando la deshidratación o minimizando sus efectos mediante el uso de estrategias que retrasan o reducen la deshidratación. Sin embargo, en eventos de estrés hídrico prolongado los mecanismo de elusión no son suficientes para sobrellevar el estrés. En este sentido, la tolerancia implica un conjunto de mecanismos que le permiten a las plantas mantener su estado fisiológico a pesar de la pérdida de agua generada por el estrés, lo cual implica la regulación de la expresión de una gran variedad de genes de respuesta para reducir o reparar los daños (Luo, 2010; Mitra, 2001). La tolerancia de las plantas al estrés hídrico es sumamente complejo e involucra cambios morfológicos, metabólicos y fisiológicos.

En el contexto del estrés hídrico, la síntesis y acumulación de hormonas, así como el contenido relativo de las mismas es esencial para la inducción de las respuestas de tolerancia al estrés, siendo el ácido abscísico (ABA) uno de los mediadores claves de esta respuesta. El ABA es una hormona vegetal que regula una amplia variedad de procesos fisiológicos asociados al desarrollo, como la germinación, el crecimiento radicular y la maduración del fruto (Brookbank *et al.,* 2021; Gupta *et al.,* 2022; Muhammad *et al.,* 2022), y su expresión es inducida en condiciones de estrés abiótico como la sequía, salinidad, el frío y el calor (Huang *et al.,* 2021; Huang *et al.,* 2016 ; Muhammad *et al.,* 2022).

El ABA es clasificada como una molécula isoprenoide y es sintetizada a partir de carotenoides derivados de isopentenil difosfato (IPP: *isopenthenyl diphosphate*) a través de de la vía metileritritol fosfato (MEP: *methylerythritol phosphate*) en los plástidos (Dejonghe *et al.*, 2018) (Fig. 1). La síntesis de ABA tiene varios pasos en donde participan diferentes enzimas. La conversión de zeaxantina en trans-violaxantina, es un proceso de epoxidación de dos pasos catalizado por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP: *zeaxanthin epoxidase*). El siguiente paso de la biosíntesis de ABA es un paso de isomerización y se da a través de una enzima desconocida. Posteriormente la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED: *9-cis epoxicarotenoide dioxigenasa*) genera el clivaje de 9-cis-violaxantina y/o 9-cis-neoxantina dando lugar a la xantoxina. Esta reacción se considera el paso limitante de la biosíntesis de ABA y es el último paso realizado en plastidios (Tan *et al*., 2003). La xantoxina se exporta al citosol y se convierte en un intermediario aldehído-abscísico mediante una serie de pasos oxidativos realizados por la enzima alcohol de cadena corta dehidrogenasa/ reductasa (SDR: *short chain alcohol dehydrogenase/reductase*) y posteriormente se oxida a ABA mediante la enzima aldehído oxidasa (AAO: *aldehyde oxidase*) (Vishwakarma *et al.*, 2017).

La síntesis de ABA se induce fuertemente en condiciones de estrés, dando lugar a cambios en la expresión de genes implicados en su propia síntesis, así como induciendo la expresión de genes de respuesta al estrés (Kim *et al.*, 2010). Dentro de los genes que se han reportado inducidos a nivel de ARNm que participan en las síntesis de ABA se pudo observar a ZEP/ABA1, AAO3 y NCED3, los cuales se inducen en forma dependiente e independiente de ABA a través de la activación de factores de transcripción de tipo ABF, MYC MYB, NAC, ERF, bZIP, y DREB/CBF (Dar *et al.,* 2017; Verma *et al.,* 2016). Se ha reportado que la sobre-expresión de ZEP en plantas transgénicas confiere mayor tolerancia a la sequía y salinidad (Park *et al.,* 2008), y que la expresión de NCED3 está altamente regulada por el estrés abiótico, especialmente por déficit hídrico tanto en *Arabidopsis* como arroz (Qin & Zeevaart, 2002; Ye *et al*., 2011).

El ABA media sus funciones a través de su interacción con receptores PYR/PYL/RCAR (Fig. 1). La unión del ABA a los receptores da lugar a la formación de complejos ABA-PYR/PYL/RCAR que inhiben a las proteínas PP2C. Esto permite la activación de las kinasas SnRK1 y SnRK2 que median la activación de factores de transcripción (TFs) de tipo bZip, MYB/MYC, NAC y AP2/ERF que son esenciales para la transducción de la señal de ABA (Abhilasha & Choudhury, 2021; Mahmood *et al.,* 2019; Belda-Palazón *et al.,* 2020). De esta manera, bajo condiciones de déficit hídrico el ABA regula la expresión de una gran variedad de genes que dan lugar a cambios morfológicos y fisiológicos que permiten a las plantas tolerar el estrés.

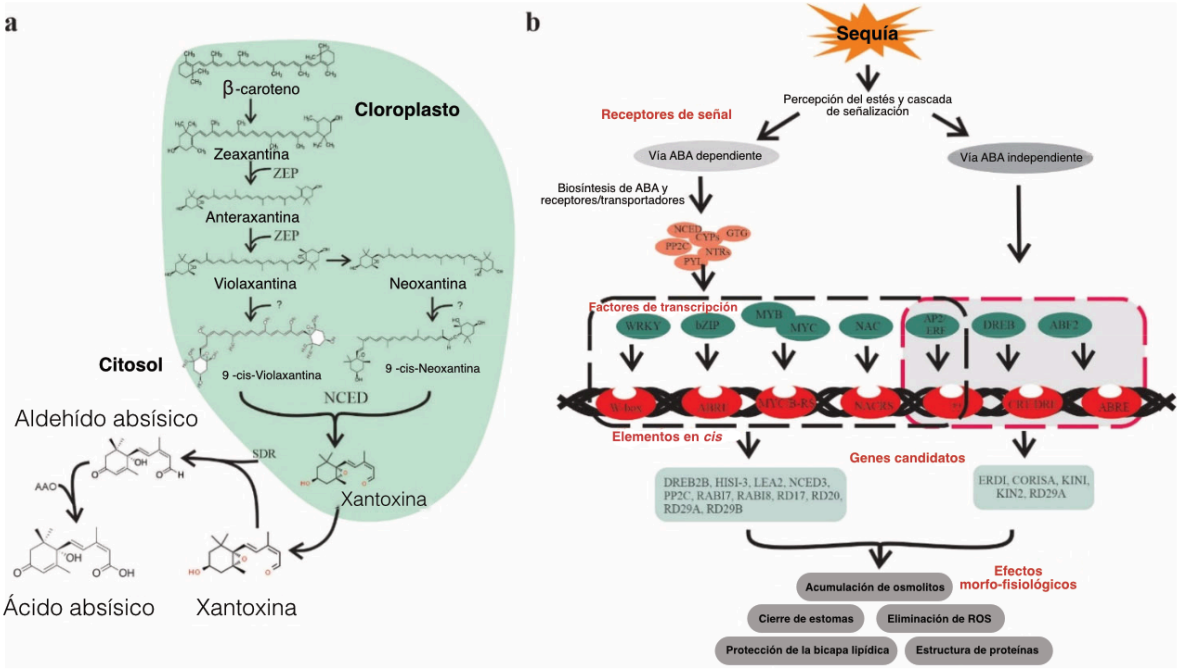


Figura 1. Vía de síntesis y señalización mediada por ABA en condiciones de déficit hídrico. A. Esquema de la vía de síntesis de ABA. El betacaroteno, precursor de ABA, atraviesa una serie de pasos oxidativos dentro de los plástidos, siendo cada proceso catalizado por diferentes enzimas como ZEP (zeaxantina epoxidasa) y NCED (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa). La xantoxina generada es exportada al citosol y convertida en ABA a través de la SDR (alcohol dehidrogenasa/reductasa) y la AAO (aldehído oxigenasa). **B.** Vías de señalización dependiente e independiente de ABA, compuesta por varios receptores y reguladores de ABA. La vía dependiente de ABA e independiente de ABA se encuentran indicadas con líneas entrecortadas negras y rojas respectivamente. Los factores de transcripción (TFs) incluyen bZIPs, MYB/MYC2, NAC (RD26) y WRKY que se unen a sus crrespondientes elementos en *cis*: W-box, ABRE, MYB, MYC, DREB2, AREB/ABF, y NACRs. Imagen adaptada de Muhammad *et al.,* 2022)

Se ha reportado que el ABA regula el balance hídrico en condiciones de sequía a través del cierre de estomas y la reducción del área foliar, disminuyendo así la pérdida de agua por transpiración (Tardieu, 2013, Daszkowska-Golec *et al.,* 2016). En este sentido Kwak *et al.* 2003 reportó que el ABA activa la biosíntesis de H2O2 en los estomas de las células guarda a través de una NADPH oxidasa, activando el cierre estomático a través de la apertura de canales de Ca2+ de la membrana plasmática (Gilroy *et al.,* 1990). La acumulación de ABA puede también modular el crecimiento de las raíces, estimulando la elongación de las células radiculares (Teng *et al.,* 2023; Daszkowska-Golec *et al.,* 2016). En este sentido se ha reportado en maíz que bajo condiciones de déficit hídrico el ABA reduce los niveles de etileno generando una restricción del crecimiento de los brotes y un aumento en el crecimiento de las raíces (Spollen *et al.,* 2000). A su vez, las auxinas inducen cambios en la morfología de las raíces, lo cual lleva a un aumento del crecimiento vertical y más profundo de las mismas (Castro *et al.,* 2018; Gupta *et al.,* 2020).

Ante la pérdida de agua, y con el fin de preservar las membranas y la homeostasis celular, las plantas activan mecanismos que les permiten reducir los daños. Esto incluye la síntesis

de proteínas de *heat-shock* y otras chaperonas, que ayudan a mantener el buen plegamiento de las proteínas y la remoción de proteínas desnaturalizadas; la síntesis de proteínas de la familia de las LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) que actúan protegiendo las estructuras celulares y las macromoléculas del daño generado durante el estrés (Yu *et al.* 2018); y las acuaporinas, que permiten regular la permeabilidad de la membrana celular (Kapilan *et al.* 2018). La síntesis de estas proteínas protectoras puede ser una respuesta dependiente de ABA (Ahmed *et al.,* 2021; Claeys & Inzé, 2013; Takahashi *et al.*, 2018), o una respuesta ABA independiente mediada por la activación de vías de señalización dependientes de Ca2+, y la actividad de cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK: *mitogen-activated protein kinase*) (Mahmood *et al.,* 2019).

En condiciones de déficit hídrico, y frente al cierre de los estomas inducido para evitar la pérdida de agua, las plantas absorben más luz de la que pueden utilizar para la fijación de carbono, lo cual da lugar a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) como radicales de oxígeno ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($OH^{\bullet}$) y oxígeno singulete ($^1O_2$). Los ROS representan un estrés para las células, ya que generan daños en las membranas y proteínas celulares. Además, disminuyen la capacidad fotosintética de las plantas, principalmente a través de la disrupción del fotosistema II (PSII) (Cruz *et al*., 2008; Dinakar *et al.*, 2012). En este contexto, algunas hormonas como el ABA, el jasmonato (JA) y el ácido salicílico, así como los brasinoesteroides ayudan a combatir el estrés oxidativo a través de la inducción de la expresión de enzimas con capacidad antioxidante, como la glutatión-S-transferasa (GDT), superóxido dismutasa (SOD), guaiacol peroxidasa (POD) y catalasa (CAT), las cuales contribuyen al mantenimiento y recuperación de los tejidos vegetales expuestos al estrés (Ahmad *et al*., 2010; Rajasheker *et al.,* 2019; Anjum *et al.,* 2011; Bandurska *et al.,* 2013; Chaudhry *et al.,* 2022; Ciura *et al.,* 2018). Además, las hormonas promueven la síntesis de compuestos no enzimáticos como el ácido ascórbico, flavonoides, glutatión, carotenoides y compuestos fenólicos (Nadarajah *et al.*, 2020).

El déficit hídrico genera grandes cambios en el metabolismo primario y secundario de las plantas, y se ha reportado que tanto la acumulación de metabolitos como la expresión de los genes involucrados en el metabolismo son sumamente importantes en las respuestas de las plantas frente al estrés (Kumar *et al.,* 2021). Por un lado, ocurren cambios en el metabolismo primario como consecuencia de la removilización de nutrientes así como por las demandas energéticas inducidas en condiciones de estrés. En este sentido, se ven aumentados algunos metabolitos en respuesta a ABA como carbohidratos, nucleótidos, y compuestos sulfurados (Zhu *et al.,* 2017). A su vez, las condiciones de estrés llevan a cambios en el metabolismo secundario, dando lugar a la síntesis de compuestos osmoprotectores y metabolitos especializados que ayudan a mitigar los efectos del estrés, dentro de los cuales se encuentran compuestos fenólicos, betaína, poliaminas y aminoácidos (Hussain *et al.,* 2011). Estos metabolitos contribuyen a mantener el potencial de agua, la turgencia celular, el ajuste osmótico, así como la estabilización de proteínas y membranas bajo condiciones de estrés hídrico, promoviendo el mantenimiento de las condiciones fisiológicas (Krasensky *et al.*, 2012).

Acumulación de aminoácidos

La acumulación de aminoácidos específicos parecería jugar un rol importante en la resistencia de las plantas frente a condiciones ambientales adversas. Uno de los aminoácidos que se acumula en condiciones de estrés es la prolina. Se ha reportado que en condiciones de estrés severo la prolina puede llegar a representar hasta un 20% de los aminoácidos libres (Heinemann *et al.,* 2021). La prolina se ha vinculado a la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés hídrico en diversas especies vegetales, y los mecanismos mediante los cuales promueve la tolerancia han sido ampliamente estudiados y caracterizados (Kavi *et al.,* 2005; Frimpong *et al.*, 2021).

Históricamente se ha propuesto que la actividad protectora de la prolina está dada por la capacidad de la misma de actuar como un osmolito, retardando así la pérdida de agua de las plantas sometidas a estrés hídrico (Yoshiba *et al.,* 1995). En esta línea, se ha propuesto que la acumulación de prolina en el citosol podría ser relevante para balancear el aumento de la osmolaridad de la vacuola, generada por la alta tasa de degradación de macromoléculas producto de procesos de autofagia inducidos por estrés (Signorelli *et al.*, 2019). Sin embargo, se han propuesto también otros mecanismos que podrían explicar la actividad protectora de la prolina. Entre ellas, se ha visto que este aminoácido funciona como una molécula chaperona, protegiendo la integridad de proteínas y aumentando la actividad de diferentes enzimas. A modo de ejemplo, se ha reportado que la prolina protege a la nitrato reductasa en condiciones de estrés osmótico o presencia de metales pesados (Sharma & Dubey, 2005); y estabiliza la actividad de catalasas y peroxidasas en condiciones de estrés osmótico (Khedr *et al.* 2003). Se ha propuesto también que la prolina podría servir como una reserva de carbono y nitrógeno promoviendo la recuperación de las plantas una vez aliviado el estrés (Hare *et al.,* 1997). Más recientemente se ha postulado que la actividad protectora de la prolina podría estar dada, no solo por la acumulación del aminoácido *per se,* sino que los procesos de síntesis y degradación (Fig. 2) podrían ser claves para el mantenimiento de las condiciones celulares en plantas sometidas al estrés (Szabados *et al*., 2010; Hayat *et al.,* 2012; Sharma *et al.,* 2011; Zheng *et al.,* 2021; Ingrisano *et al.,* 2023).

En plantas la prolina es sintetizada principalmente a partir de glutamato, mediante las enzimas pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS: *Pyrroline-5-carboxylate synthase*) y la pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR: *Pyrroline-5-carboxylate reductase*), ambas de localización predicha citosólica. La P5CS está codificada por dos genes que dan lugar a las proteínas P5CS1 y P5CS2. Se ha reportado que en células expuestas a condiciones de estrés salino y osmótico, P5CS1 y P5CR cambian su localización subcelular acumulándose en el cloroplasto, mientras que P5CS2 mantiene su localización citosólica (Szekely *et al.,* 2008). De esta manera se propone que la síntesis basal de prolina se da en el citoplasma por acción de la P5CS2, mientras que en condiciones de estrés osmótico la síntesis pasa a darse principalmente en el cloroplasto por acción de la P5CS1 (Szekely *et al.,* 2008; Savoure *et al*., 1995; Strizhov *et al.*, 1997). La inducción y acumulación de las enzimas biosintéticas P5CS1 y P5CR en el cloroplasto da lugar a la acumulación de prolina en este compartimento. Dado que en condiciones de estrés el ciclo de Calvin se ve disminuido como consecuencia del cierre estomático, el NADPH generado en los tilacoides no puede ser regenerado a NADP+. A falta de este aceptor de electrones, y en condiciones de alta

exposición a la luz, el flujo de transporte de electrones del aparato fotosintético se suprime llevando a la generación de oxígeno singulete en el fotosistema I (PSI), dando lugar a la acumulación de ROS (Chaves *et al.,* 2009). Dado que la síntesis de prolina mediada por las enzimas P5CS1 y P5CR requiere de NADPH como poder reductor, la síntesis de este aminoácido en el cloroplasto utiliza el exceso de poder reductor generado en condiciones de estrés, reciclando el NADP+. A su vez, la fosforilación del glutamato para la síntesis de prolina consume ATP, lo cual permite regenerar el ADP necesario para la síntesis de ATP durante la fotosíntesis. De esta manera, un aumento en la biosíntesis de prolina durante el estrés permite mantener bajo el balance NADPH/NADP+, contribuye al mantenimiento del transporte de electrones entre los centros de excitación de los fotosistemas, estabiliza el balance redox, y reduce la fotoinhibición y el daño del aparato fotosintético (Hayat *et al.,* 2012; Sharma *et al.,* 2011; Zheng *et al.,* 2021; Alia & Mohanty, 1997).

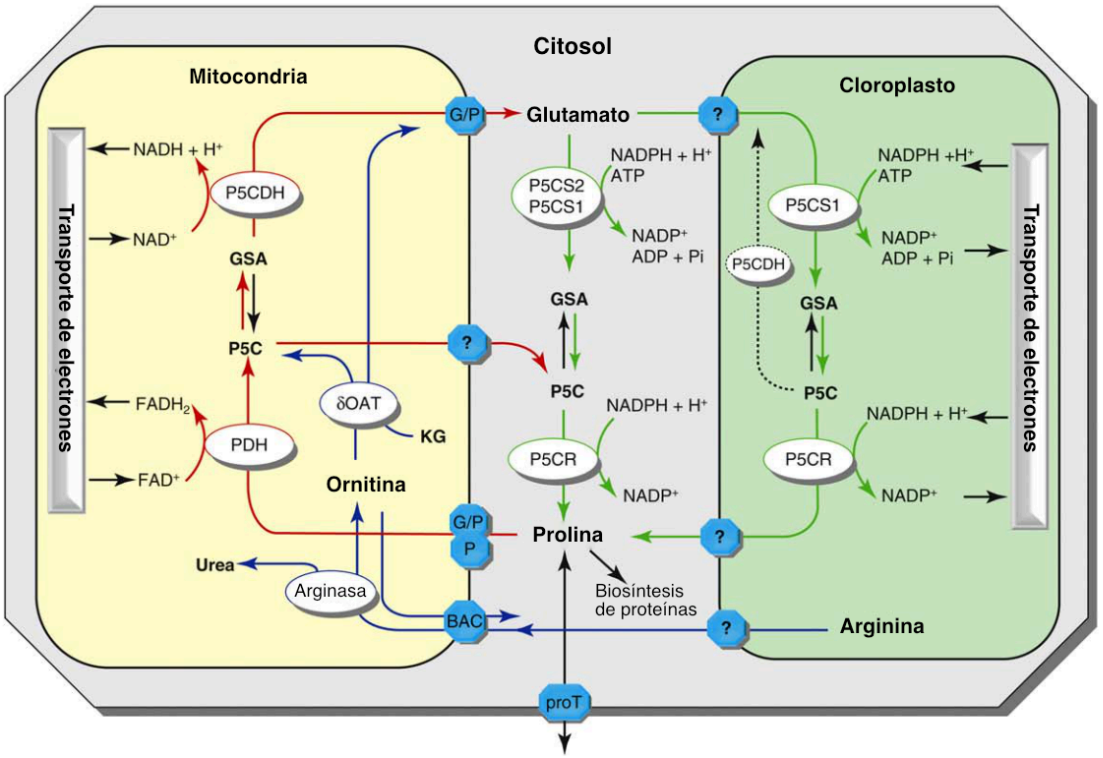


Figura 2. Modelo propuesto del metabolismo de prolina en plantas superiores. La vía biosintética está marcada en líneas verdes, y la vía catabólica en líneas rojas. En células embrionarias y de meristema la síntesis de prolina ocurre en el citosol y es mediada por las enzimas P5CS y P5CR. En condiciones de estrés P5CS1 se acumula en cloroplastos, llevando a un enriquecimiento de síntesis de prolina en plástidos. La degradación de la prolina ocurre en la mitocondria donde la prolina es oxidada a P5C y glutamato en reacciones secuenciales llevadas a cabo por las enzimas PDH y P5CDH. El PC5 mitocondrial puede ser reciclado a prolina en el citosol por P5CR. Las enzimas están maduradas con elipses y los transportadores con octogonos azules. Glu: glutamato, G/P: transportador mitocondrial glutamato/prolina, KG: α-alfacetoglutarato; P: transportador mitocondrial de prolina, Pi: fosfato inorgánico, ProT: transportador de prolina de la membrana plasmática, ?: transportadores no identificados. Imagen adaptada de Szabados *et al*., 2010.

Por otro lado, el catabolismo de la prolina se da en la mitocondria mediante la acción secuencial de las enzimas prolina deshidrogenasa (PDH:*Proline dehydrogenase*) que genera pirrolina-5-carboxilato (P5C: *Pyrroline-5-carboxylate*) a partir de la prolina; y la P5C deshidrogenasa (P5CDH: *Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase*) que convierte el P5C en glutamato. La degradación de la prolina por esta vía provee de poder reductor a la cadena de transporte de electrones, debido a la generación de FADH2 y NADH. De esta manera, la degradación de la prolina dentro de la mitocondria genera un aporte energético que contribuye a la respiración mitocondrial, lo cual podría promover el mantenimiento de las condiciones celulares en condiciones de déficit energético, y la recuperación de las plantas expuestas a condiciones de estrés (Hare & Cress 1997; Kavi *et al.,* 2005; Deuschle *et al.*, 2001; Boggess & Koeppe, 1978).

En conjunto, la acumulación de prolina así como los procesos metabólicos de síntesis y degradación de la misma, hacen de la prolina un aminoácido sumamente importante, que promueve el mantenimiento de las condiciones fisiológicas en plantas sometidas a condiciones de estrés.

Acumulación de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs)

Recientemente se ha reportado que la valina , leucina e isoleucina , colectivamente llamadas aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs: *Branched chain amino acids*) se acumulan en varias especies vegetales expuestas a condiciones de estrés, promoviendo la tolerancia de las plantas frente a dichas condiciones ambientales (Bowne *et al.*, 2012; Templer *et al.,* 2017; Shim *et al.*, 2023). Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos que subyacen a la tolerancia de las plantas mediada por la acumulación de estos aminoácidos. Se ha propuesto que los BCAAs podrían promover la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés abiótico actuando como osmolitos (Taylor *et al*., 2004; Joshi *et al.,* 2010; Huang & Jander, 2017; Fabregas & Fernie, 2019); así como actuando como moléculas señalizadoras del estrés (Heinemann *et al*., 2021). También se ha evidenciado que la isoleucina puede regular el metabolismo de prolina (Pro) a través de la activación del sistema TOR, inhibiendo la expresión de vías catabólicas de la misma y promoviendo la acumulación de prolina en condiciones de estrés (O'Leary *et al.,* 2019).

La acumulación de BCAAs depende de los procesos de síntesis, degradación y transporte. En este sentido, la regulación transcripcional de las enzimas que participan en el metabolismo de BCAAs parece ser importante en la acumulación de estos aminoácidos, especialmente en plantas expuestas a condiciones de estrés (Knill *et al.,* 2008; Chen *et al.*, 2010; Joshi *et al*., 2010).

La biosíntesis de BCAAs en plantas ocurre principalmente en plástidos (Fig. 3), y varias de las enzimas involucradas en este proceso tienen señales de localización plastídica (Diebold *et al*., 2002; Graham & Eastmond 2002; Maloney *et al*., 2010; Xing & Last, 2017). La biosíntesis de BCAAs está altamente conservada a lo largo de la evolución, desde bacterias hasta plantas angiospermas (Diebold *et al*., 2002; Ellerström *et al*., 1992; Binder, 2010; Curien *et al.,* 2008). La isoleucina (Ile) es sintetizada a partir de piruvato y 2-oxobutanoato, siendo estos compuestos productos de la degradación de la Treonina mediada por la

treonina desaminasa (TD: *threonine deaminase*). La valina (Val) es sintetizada a partir de dos moléculas de piruvato, y comparte cuatro enzimas con la vía de la Ile. La síntesis de leucina (Leu) se da como ramificación del último paso de la vía de síntesis de Val. La acetohidroxiácido sintasa (AHAS: *acetohydroxyacid synthase*) es responsable del primer paso de la biosíntesis de BCAAs, al catalizar la condensación de un piruvato con un 2-oxobutanoato (Ile) o alternativamente, de dos piruvatos (Val y Leu). La cetoácido reductoisomerasa (KAR: *ketolacid reductoisomerase*) cataliza los siguientes dos pasos de la síntesis de BCAAs, con un paso de isomerización que requiere de la presencia de Mg2+ y NADPH. Posteriormente, la dihidroxiácido desidratasa (DHAD: *dihydroxyacid dehydratase*) produce los 2-oxoácidos de cadena ramificada 3-metil-2oxobutanoato (3MOB) y 3-metil-2-oxopentanoato (3MOP), los cuales pueden ser transformados en sus correspondientes aminoácidos Val e Ile respectivamente. El 3MOB también puede ser utilizado como sustrato para la síntesis de Leu a través de la acción de la isopropilmalato sintasa (IPMS: *isopropylmalate synthase*). Los siguientes pasos de síntesis de Leu son catalizados por la isopropilmalato isomerasa (IPMI: *isopropylmalate isomerase*) y la isopropilmalato deshidrogenasa (IPMDH: *isopropylmalate dehydrogenase*), que dan lugar al 4-metil-2-oxopentanoato (4MOP). El último paso de síntesis de BCAAs es llevado a cabo por aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT: *Branched-Chain Amino acid Transferase*) que dan lugar a la transaminación de los 2-oxoácidos a su correspondiente aminoácido (Binder, 2010; Pratelli & Pilot, 2014). En *Arabidopsis*, tres de las enzimas que participan en la síntesis de BCAAs (TD, AHAS e IPMS) se encuentran reguladas alostéricamente por los BCAAs a los cuales dan lugar (Fig. 3). De esta manera, la TD es inhibida por Ile, siendo este efecto revertido por la acumulación de Val (Halgand *et al.*, 2002); la AHAS es inhibida por todos los BCAAs, y se ha evidenciado que Leu e ILe, así como la presencia de Leu y Val tienen efectos sinérgicos, presentando estos últimos un efecto inhibitorio particularmente grande (Curien *et al.,* 2008); y la IPMS es regulada por Leu, inhibiendo así su propia síntesis.

Se ha reportado que algunas enzimas de la vía de síntesis de BCAAs, como la IPMI y IPMDH1 que participan en la síntesis de Leu, así como algunas BCATs, también participan en el metabolismo de la metionina (Met). La Met además de ser un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas tiene un importante rol en condiciones de estrés. Generalmente está presente en las células en forma de S-adenilmetionina (SAM) el cual es utilizado en reacciones de metilación y como un precursor de la síntesis de etileno y poliaminas (Malatrasi *et al*., 2006). La degradación de Met vía IPMI, IPMDH1 y BCATs puede dar lugar a la síntesis de glucosinolatos derivados de metionina (Kroumova & Wagner, 2003; Schuster *et al.,* 2006; Knill *et al.,* 2008; Halkier & Gershenzon, 2006), los cuales son conocidos por conferir tolerancia a las plantas frente a herbívoros (Halkier & Gershenzon, 2006). Recientemente se ha reportado que los glucosinolatos derivados de metionina promueven también el cierre estomático, y se propone que podrían jugar un rol importante en plantas expuestas a condiciones de estrés abiótico (Salehin *et al*., 2019).

El primer paso del catabolismo de BCAAs (Fig. 4) es mediado por enzimas BCATs que catalizan la conversión de los BCAAs a sus correspondientes α-cetoácidos. Posteriormente, los α-cetoácidos son degradados por las enzimas α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCKD: *branched-chain keto acid dehydrogenase*) y la enzima isovaleril-CoA deshidrogenasa (IVD: *Isovaleryl-CoA Dehydrogenase*). En el caso de Leu, la siguiente enzima que participa en la degradación es la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa

(MCCase: *3-methlycrotonyl-CoA carboxylase*) siendo el producto de esta reacción utilizado por la enoil-CoA dehidratasa (ECH: *Enoyl-CoA Dehydratase*), enzima que participa también en la degradación de Val e Ile, dando lugar a hidroxiacil-CoA. En última instancia la degradación da lugar a propionil-CoA en la caso de Val; propionil-CoA y acetil-CoA en el caso de Ile; y acetil-coA y acetoacetato en el caso de Leu (Binder, 2010; Graham & Eastmond, 2002).

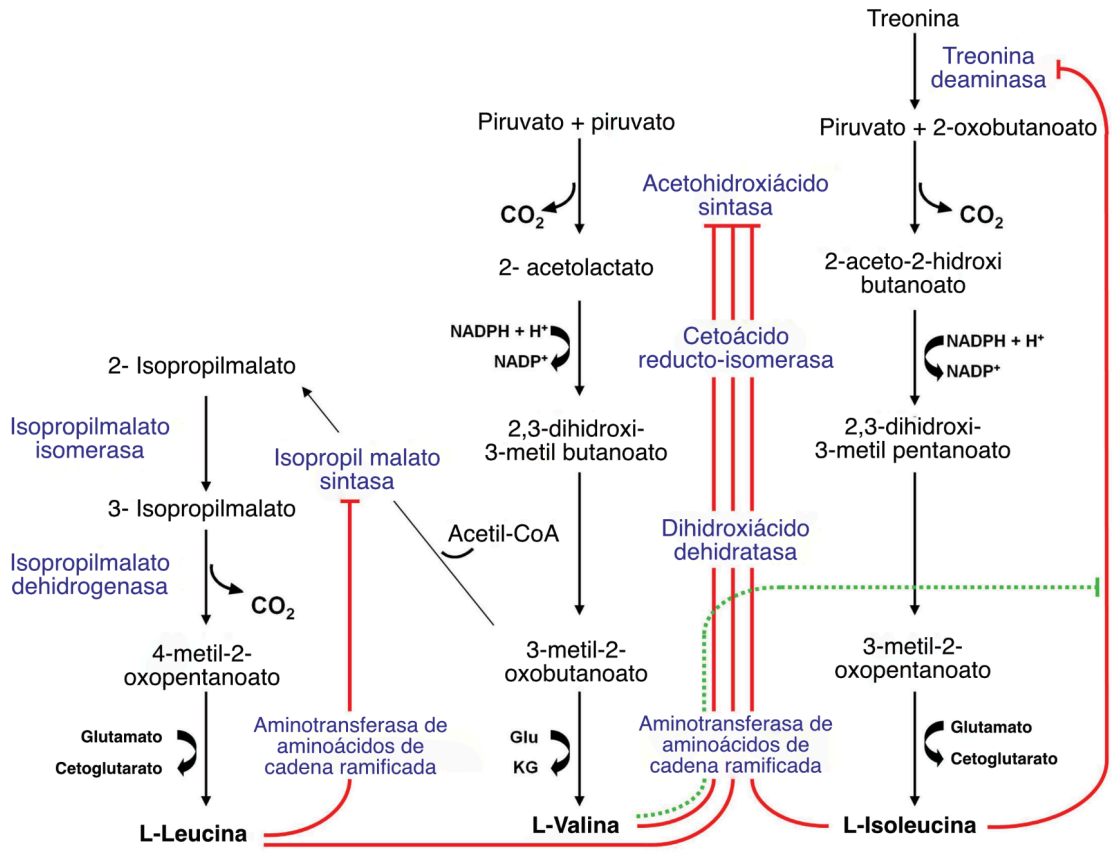


Figura 3. Biosíntesis de BCAAs en plantas. Las enzimas se encuentran en azul y los metabolitos en negro. La inhibición alostérica está indicada con líneas rojas. El efecto de restauración de L-Valina en la inhibición de la treonina desaminasa mediado por L-Isoleucina está marcado en verde. Imagen adaptada de Binder *et al*., 2010.

Se propone que los BCAAs promueven su propio metabolismo en condiciones de falta de azúcares (Taylor *et al.*, 2004), y se ha reportado que algunas enzimas del catabolismo de BCAAs, como la IVD, algunas BCATs y la BCKD, se inducen en condiciones de estrés abiótico (Peng *et al.*, 2015; Joshi *et al*., 2010; Fujiki *et al*., 2002). A su vez, la actividad de las BCATs está regulada por el estatus redox celular, debido a la presencia de un motivo (CXXC) en las enzimas que las hace sensibles a la presencia de peróxido de hidrógeno (Conway, 2021).

Se ha evidenciado que tanto los BCAAs como algunos α-cetoácidos de cadena ramificada estimulan la respiración mitocondrial, sugiriendo que al menos parte del metabolismo de BCAAs se da en las mitocondrias. A su vez, varias de las enzimas que participan en la degradación de BCAAs han sido localizadas en la mitocondria por LC-MS/MS, incluyendo

toda la vía catabólica de Leu (Anderson *et al.,* 1998). Sin embargo, no se han encontrado enzimas clave en el metabolismo final de Ile y Val en la mitocondria. Este resultado junto con la aparente presencia de enzimas en los peroxisomas sugiere que el catabolismo de estos aminoácidos podría requerir el transporte del hydroxiacil-CoA desde la mitocondria a los peroxisomas, seguido del transporte de los productos de nuevo a la mitocondria para los pasos finales del metabolismo de Val e Ile (Taylor *et al*., 2004).

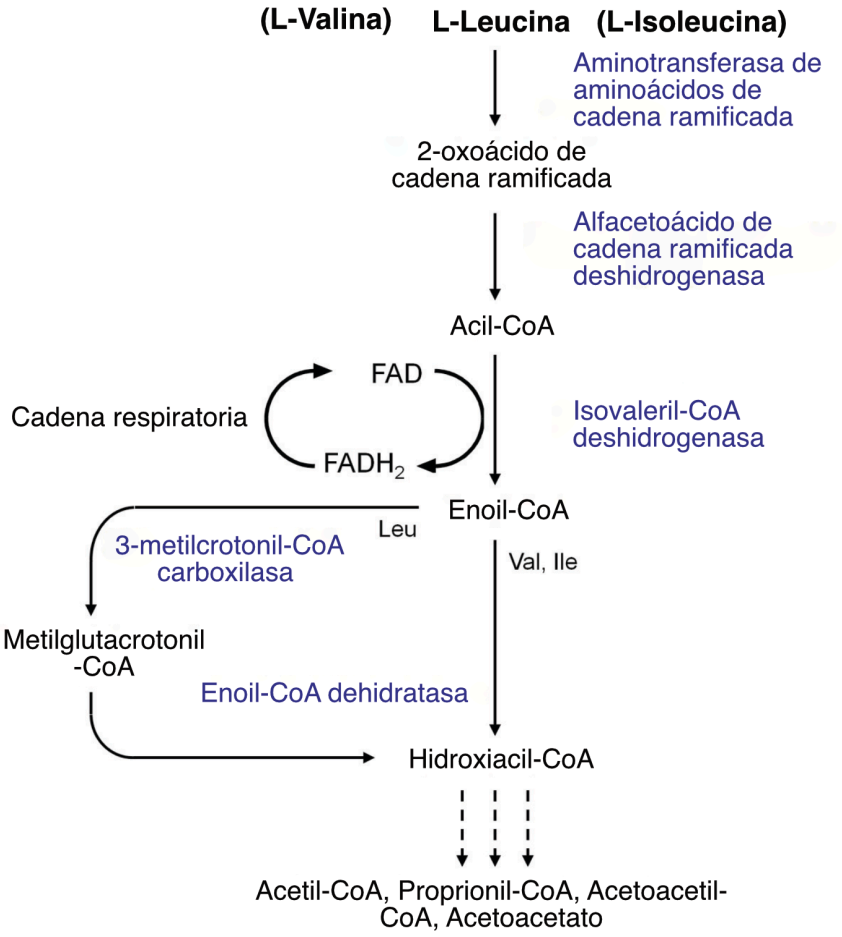


Figura 4. Catabolismo de BCAAs en plantas. Las enzimas se encuentran en azul y los metabolitos en negro. Imagen adaptada de Binder *et al*., 2010.

Se ha reportado que el catabolismo de BCAAs está físicamente conectado con la cadena respiratoria, ya que reacciones de un solo paso en la degradación de los mismos permiten donar electrones a través del complejo de la flavoproteína-ubiquinona reductasa. De esta manera, cuando la IVD cataliza la oxidación de isovaleril-CoA en 3-metilcrotonil-CoA transfiere los electrones a la cadena respiratoria a través de la ubiquinona vía FAD, la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF: *electron-transfer flavoprotein*) y la flavoproteína de transferencia de electrones ubiquinona reductasa (ETFQO: *electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase*) (Taylor *et al*., 2004; Ishizaki *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2011). A su vez, algunos productos de la degradación de los BCAAs pueden ser utilizados como fuente alternativa de energía, ya que el propionil-CoA puede ser

convertido a succinil-CoA, y junto al acetil-CoA pueden entrar directamente al ciclo de Krebs (Graham & Eastmond 2002). Llamativamente, la oxidación de los BCAAs da lugar a la misma cantidad de energía en forma de ATP que la glucosa (Hildebrandt *et al.*, 2015). Por esta razón se ha propuesto que los BCAAs pueden ser una fuente de energía especialmente importante en condiciones de déficit energético inducido por estrés (Galili *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha reportado que en algunos casos la acumulación de BCAAs o el desbalance de los mismos puede tener efectos nocivos en las plantas. Se ha observado en *Arabidopsis* que la acumulación de Val junto con la disminución de contenido de Leu, dada por la pérdida de función de la IPMS1, genera cambios en el citoesqueleto a través de la reorganización de los filamentos de actina alterando la morfogénesis vacuolar y la distribución del retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi. Además, el desbalance en BCAAs genera alteraciones en la estructura de cloroplastos y afecta el desarrollo de las plantas, disminuyendo el crecimiento de hojas y raíces, siendo estos cambios modulados TOR (Cao *et al*., 2019). También se ha reportado que en plantas de durazno la suplementación con Val en concentraciones mayores a 10 g/L genera un aumento en los niveles de Val endógenos, inhibiendo el crecimiento de nuevos brotes (Li *et al.,* 2020). En este sentido, se propone que el catabolismo de BCAAs podría funcionar como un mecanismo de detoxificación, que permite mantener el pool de BCAAs necesario para la síntesis proteica y para el mantenimiento de las funciones celulares, pero previniendo que se acumulen a niveles citotóxico (Taylor *et al*., 2004; Malatrasi *et al*., 2006).

Aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada (BCATs)

Siendo las BCATs enzimas que participan en el último paso de síntesis y en el primer paso de la degradación de BCAAs, podrían tener un rol importante en la regulación del contenido de BCAAs en plantas. Sin embargo, poco se sabe acerca de estas enzimas en especies vegetales. Se han identificado y caracterizado enzimas BCAT en distintas especies de interés agronómico como plantas de arroz, cebada y tomate, así como en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Schuster & Binder, 2005; Binder, 2010; Maloney *et al.*, 2010; Malatrasi *et al.,* 2006; Buffagni *et al*., 2020). Más recientemente se comenzaron a identificar genes candidatos a BCAT, pero poco se sabe acerca de las proteínas codificantes (Do *et al.,* 2022).

En *Arabidopsis* se ha descrito toda la familia de BCATs. Está compuesta por siete genes codificantes, seis de los cuales dan lugar a las proteínas BCAT1 (At1g10060), BCAT2 (At1g10070), BCAT3 (At3g49680), BCAT4 (At3g19710), BCAT5 (At5g65780) y BCAT6 (At1g50110), mientras que el gen codificante para BCAT7 (At1g50090) parecería ser un pseudogen (Binder, 2010). BCAT1 es una proteína mitocondrial y se propone que participa en el primer paso de degradación de los BCAAs (Schuster & Binder, 2005). BCAT1 se transcribe en todos los tejidos de la planta excepto en raíces y presenta una respuesta muy baja a estímulos externos. En este sentido, su expresión no es inducida por oscuridad ni falta de carbohidratos, lo cual es observado para el resto de enzimas que participan en la degradación de BCAAs (Binder, 2010), sin embargo si se ha visto que se induce su expresión en condiciones de estrés salino (Joshi *et al*., 2010). Se ha observado que BCAT1 puede utilizar tanto Met como su correspondiente α-cetoácido como sustratos, sugiriendo

un posible rol en el metabolismo de la Met (Malatrasi *et al.*, 2006). BCAT2 presenta una expresión basal baja, y se induce fuertemente en respuesta a la acumulación de ABA (Urano *et al.*, 2009), a condiciones de falta de carbono (Schuster & Binder, 2005) así como en condiciones de estrés salino (Joshi *et al.*, 2010). La localización subcelular de BCAT2 se reportó plastídica (Matsui *et al.*, 2008), sin embargo estudios más recientes la propusieron como una proteína mitocondrial que participa en el catabolismo de BCAAs (Angelovici *et al.*, 2013). En marco con esta propuesta, se reportó que la sobre-expresión de BCAT2 en plantas de *Arabidopsis* disminuye significativamente el contenido de BCAAs en condiciones de estrés por manitol, pero no en condiciones normales de crecimiento, por lo que se propone que BCAT2 es una enzima catabólica y su función podría ser principalmente importante en condiciones de estrés (Huang & Jander, 2017). BCAT3 es una proteína de localización plastídica y presenta una función dual. Participa en la síntesis de BCAAs, presentando una velocidad máxima de reacción, y una mayor afinidad para el 3MOB (precursor de Val) que para el 3MOP (precursor de Ile). También se ha visto que puede utilizar al 4-metiltiol-2-oxobutanoato (MTOB: *4-methylthio-2-oxobutanoate*) como sustrato, el cual es un intermediario de la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos derivados de Met. Por esta razón, se propone que BCAT3 podría participar tanto en la síntesis de BCAAs como de glucosinolatos, participando así en el metabolismo primario y secundario de las plantas (Knill *et al.*, 2008). BCAT4 se ha reportado de localización citosólica y no parecería presentar afinidad con Val ni Ile, ni tampoco por sus correspondientes 2-oxo-ácidos. Presenta afinidad *in vitro* con Leu y con su 2-oxoácido 4MOP, sin embargo en plantas mutantes para BCAT4 no parecía haber cambios significativos en la acumulación de Leu, por lo cual su participación en la síntesis de BCAAs no está clara. Por otro lado, se ha observado que presenta actividad con MTOB y 4-metiltiol-2-oxopentanoato (MTOP: *4-methylthio-2-oxopentanoate*), intermediarios de la síntesis de derivados de Met (Schuster *et al.,* 2006), sugiriendo que la actividad de BCAT4 podría estar más relacionada con la síntesis de glucosinolatos alifáticos. BCAT5 se ha reportado tanto en cloroplasto como en mitocondria, aunque la presencia en mitocondria es controversial. Se expresa constitutivamente en un nivel moderado y se propone que podría participar en la biosíntesis de BCAAs así como en la síntesis de glucosinolatos (Diebold *et al*., 2002; Taylor *et al*., 2004; Zybailov *et al.*, 2008). BCAT6 es citosólica y se expresa a muy bajos niveles siendo mayor en el ápice de los brotes y los tips de las raíces y es capaz de transaminar Val, Leu e Ile, así como sus correspondientes 2-oxoácidos, y tiene afinidad por Met y MTOB (Diebold *et al*., 2002; Schuster & Binder, 2005).

Expresión de enzimas BCAT y tolerancia al estrés en plantas

Se ha reportado que la sobre-expresión de enzimas BCAT en plantas sometidas a condiciones de estrés da lugar a la acumulación de BCAAs, y al aumento de tolerancia de las plantas frente a dichas condiciones ambientales (Urano *et al.*, 2009; Joshi *et al*., 2010).

Un estudio reciente de Scarpeci *et al.,* 2017, ha demostrado que plantas de *Arabidopsis knock out* para BCAT3 son más sensibles al estrés hídrico, presentando un menor crecimiento y rendimiento de semillas que las plantas WT (*wild type*). Además se evidenció que plantas sobre expresantes del gen *AtERF019*, el cual codifica a un factor de transcripción de tipo AP2/ERF, acumula una mayor cantidad de BCAT3 y presenta una

mayor tolerancia frente a condiciones de estrés. En base a estos resultados, se propone que la acumulación de BCAT3 podría dar lugar a una mayor acumulación de BCAAs y glucosinolatos, promoviendo así la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés hídrico.

Por otro lado, también se ha reportado que en condiciones de estrés hídrico aumenta la expresión de enzimas BCAT que participan en el catabolismo de BCAAs. En este sentido, Malatrasi *et al.,* 2006 identificó un gen codificante a BCAT en cebada llamado *Hvbcat-1* cuya transcripción aumenta en plantas sometidas a estrés hídrico. A pesar de que este gen se agrupa por homología de secuencia con BCATs reportadas de localización cloroplástica, se postula que *Hvbcat-1* podría participar en la degradación de BCAAs dada su actividad catalítica observada *in vivo* por complementación, y la presencia de una señal de localización mitocondrial en su secuencia nucleotídica. En este trabajo proponen que la sobre-expresión de esta BCAT mitocondrial podría tener un rol importante en la degradación de BCAAs evitando que se acumulen dando lugar a concentraciones citotóxicas.

El grupo de Buffagni *et al*., 2020 identificó un gen codificante a una BCAT en arroz (*TdBCAT*) de localización predicha cloroplástica, que se induce frente a condiciones de estrés hídrico y se asocia a una mayor acumulación de BCAAs y una mejor performance de las plantas frente a estas condiciones ambientales. En este trabajo se realizó un estudio comparativo utilizando dos genotipos de arroz con respuestas contrastantes frente al déficit hídrico: el genotipo Cappelli de fenotipo tolerante y el Colosseo de fenotipo susceptible. Se observó que en hojas del genotipo Cappelli se induce el gen *TdBCAT* en condiciones de estrés hídrico con un fold change de 13 para el alelo A y 16 para el alelo B, mientras que no se vió inducción en el genotipo Colosseo. A su vez se evidenció la acumulación de BCAAs en hojas de ambos genotipos en respuesta al estrés hídrico, siendo mayor el incremento en el genotipo Cappelli. En base a estos resultados se propone que la sobre-expresión de *TdBCAT* en plantas de arroz podría explicar la acumulación de BCAAs en condiciones de estrés hídrico, así como las distintas respuestas al estrés entre ambos genotipos de arroz.

El grupo del Prof. Kim estudia la respuesta de las plantas de arroz frente a condiciones de estrés abiótico. En este contexto, identificó y caracterizó un gen BCAT de arroz llamado *OsDIAT* (*OsDIAT: Oryza sativa Drought Induced Amino Acid Transferase*) (Shim *et al.*, 2023), que se expresa principalmente en raíces de arroz en condiciones normales de crecimiento, y se induce significativamente en condiciones de estrés hídrico, salino y de bajas temperaturas. El grupo reportó que las plantas de arroz acumulan BCAAs en condiciones de estrés hídrico, y que la sobre-expresión del gen *OsDIAT* bajo el control de un promotor constitutivo aumenta los niveles de BCAAs en condiciones normales de crecimiento, siendo la diferencia aún mayor en condiciones de estrés hídrico. Además se evidenció que la sobre-expresión de *OsDIAT* en plantas de arroz mejora la tolerancia de las plantas expuestas a condiciones de déficit hídrico, y genera un mejor rendimiento de grano que las plantas WT. Ensayos de expresión permitieron confirmar la localización predicha citosólica de OsDIAT, y la evaluación de la actividad enzimática *in vitro* mostró que presenta una mayor eficiencia en catalizar la reacción de α-cetoácidos a BCAAs que la reacción reversa. En base a estos resultados se propone que OsDIAT participa en la biosíntesis de BCAAs en plantas de arroz, siendo su rol particularmente importante en condiciones de déficit hídrico, promoviendo la tolerancia de las plantas en condiciones de estrés.

Antecedentes

El presente proyecto de tesis se da en el marco de una colaboración científica entre nuestro grupo y el grupo del Prof. Ju-Kon Kim de la Universidad Nacional de Seúl (Corea del Sur) con el fin de identificar y caracterizar un gen de soja ortólogo de *OsDIAT (GmDIAT: Glycine max Drought Induced Aminotransferase)*, con el fin de generar herramientas biotecnológicas que permitan mejorar la tolerancia de la soja al estrés hídrico.

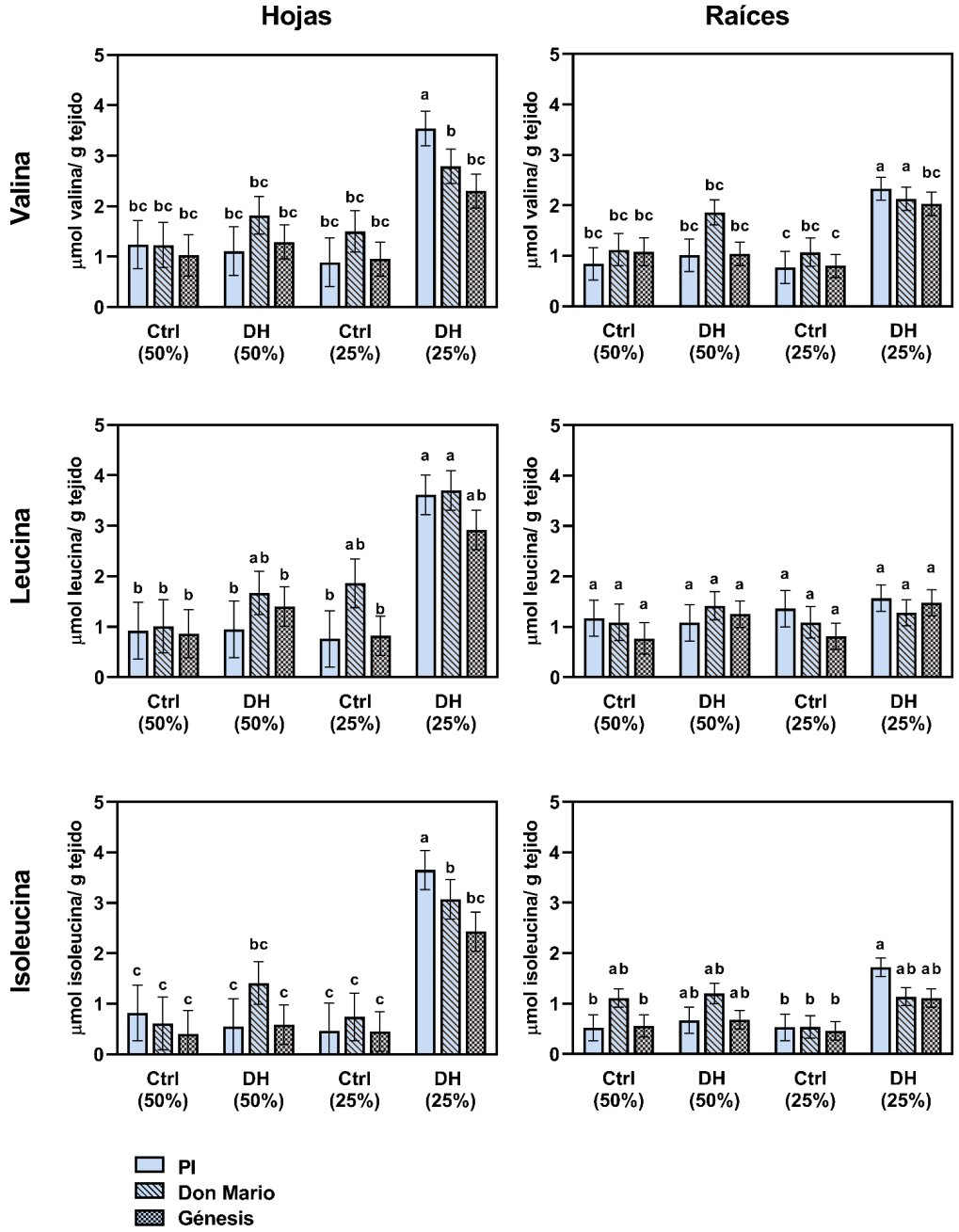


Figura 5. Niveles de BCAAs en genotipos contrastantes de soja crecidos bajo condiciones de déficit hídrico y condición control. Se analizó el contenido de Valina, Leucina e Isoleucina de hojas y raíces en los genotipos de soja PI416937 (PI), DM6.2 (Don Mario) y Génesis 5601 (Génesis), en

condiciones óptimas (Ctrl 25% y Ctrl 50 %), y bajo déficit hídrico: 50 % capacidad sustrato (DH 50 %) o 25 % de capacidad de sustrato (DH 25 %). Barras que comparten alguna letra en común no presentan diferencias significativas con un p-valor ≤0,05.

En ese contexto, como punto de partida del proyecto, se determinó la acumulación de BCAAs mediante HPLC-FLD, en tres genotipos de soja que exhiben una respuesta fenotípica contrastante al déficit hídrico: DM 6.2i (DM) y Génesis 5601 (Génesis) y el genotipo PI 416537 (PI). Los primeros dos genotipos son cultivares de soja generados por la empresa Grupo Don Mario (DM) o por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (Génesis), mientras que el genotipo PI (*Plant Introduction*) es una línea de marchitamiento lento (*slow wilting*), utilizada como fuente de genes para incrementar la tolerancia al estrés hídrico (Kunert *et al.,* 2020). En ese estudio se realizaron ensayos sobre plantas de soja en el estadío V3, sometidas a déficit hídrico severo (25% de capacidad de agua en el sustrato), o moderado (50% de contenido de agua en el sustrato). La acumulación de BCAAs fue medida tanto en hojas como en raíces, en condiciones de estrés y control. Los resultados de este ensayo pueden observarse en la Fig. 5.

Todos los genotipos de soja acumularon una mayor cantidad de BCAAs al estar expuestas a condiciones de déficit hídrico severo (DH 25%) respecto a la condición control de crecimiento (Ctrl 25%). A su vez, se observó una correlación entre la acumulación de BCAAs de los distintos genotipos de soja y su tolerancia a las condiciones de estrés, siendo el genotipo de marchitamiento lento PI416937 el que presenta una mayor acumulación de BCAAs en condiciones de estrés.

Estos resultados evidencian que las plantas de soja acumulan BCAAs en condiciones de estrés hídrico, al igual que lo hacen otras especies vegetales. Teniendo en cuenta que la acumulación de BCAAs puede ser importante en la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés hídrico, se propuso estudiar el metabolismo de estos aminoácidos en plantas de soja en condiciones de estrés.

Hipótesis

La acumulación de BCAAs en plantas de soja sometidas a condiciones de déficit hídrico está determinada, al menos en parte, por la expresión de enzimas BCAT que participan en su metabolismo.

A partir de la secuencia codificante del gen *OsDIAT* de arroz es posible encontrar un gen ortólogo con homología funcional en soja (*GmDIAT*).

La proteína codificada por el gen *GmDIAT* está asociada al metabolismo de los BCAAs participando en su síntesis y/o degradación.

La expresión endógena de *GmDIAAT* se ve aumentada en condiciones de estrés ambiental y su sobre-expresión en plantas de *Arabidopsis* genera un aumento en la concentración de BCAAs, y un incremento en la resistencia de las plantas frente a condiciones de estrés hídrico.

Objetivos

Objetivo general:

Identificar un gen ortólogo con homología funcional a *OsDIAT* en soja y evaluar su rol en el metabolismo de BCAAs y la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés abiótico.

Objetivos específicos:

1) Identificar y caracterizar genes ortólogos de *OsDIAT* en soja*,* con posible homología funcional.
2) Determinar la localización intracelular de la proteína codificada por el gen *GmDIAT*.
3) Determinar el rol de GmDIAT en la síntesis y degradación de BCAAs.
4) Determinar el efecto de la sobre-expresión de *GmDIAT* sobre la tolerancia al estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana.*

Materiales y métodos

1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

1.1. *Glycine max* (soja)

Se utilizaron 3 genotipos de soja que presentan respuestas contrastantes al déficit hídrico. DM 6.2i (DM) y Génesis 5601 (Génesis) son cultivares de soja generados por la empresa Don Mario (Argentina) y por el INIA (Uruguay) respectivamente, y el genotipo PI 416537 (PI) el cual es una línea (*Plant Introduction*), de marchitamiento lento (*slow wilting*).

Las semillas de soja fueron esterilizadas superficialmente con gas cloro y germinadas en bandejas de plástico cubiertas con servilletas embebidas en agua miliQ con PPM 1 %. Una vez germinadas, las plantas fueron trasplantadas a macetas con turba y perlita en relación 3:1 y cultivadas en cámara de crecimiento bajo lámparas de halogenuro metálico y lámparas de vapor de sodio a alta presión, con una intensidad lumínica de 800 µmol fotones m^{-2} seg^{-1} y un fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad, a 25 ºC. Se regaron por inmersión en bandejas con agua destilada, suplementando con 2 g/L del fertilizante Hakaphos.

1.2. *Arabidopsis thaliana*

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del genotipo Columbia Col-0. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente incubándolas en EtOH 70 % por 5 minutos, seguido de una incubación en una solución compuesta por 25 g/L de hipoclorito de sodio y Tritón X-100

al 0,1 %, durante 15 minutos en agitación. Se realizaron al menos 4 lavados de las semillas con agua milliQ estéril y se dejaron a 4 °C por 3-5 días para su estratificación.

Para la selección de las plantas transgénicas pK7FWG2,0-GmDIAT se germinaron las semillas *in vitro* en placas de petri conteniendo medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con la mitad de concentración de sales (MS½ : 2 g/L medio MS, 0,5 g MES, pH 5,7 y 0,8 % agar) y conteniendo 100 mM de kanamicina. Las placas fueron incubadas en una cámara de crecimiento bajo lámparas de luz LED con una intensidad lumínica de 120 µmol fotones m-2 seg-1, un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, a 22 °C durante 1-2 semanas. Las plantas fueron trasplantadas a macetas con turba y se cultivaron en cámara de crecimiento con luces LED a 120 µmol fotones m^{-2} seg^{-1} de intensidad lumínica y un fotoperiodo de 16 h luz /8 h oscuridad a 25°C. Como solución de riego se utilizó agua destilada suplementada con medio MS ½ una vez a la semana.

Para la selección de las plantas transgénicas pUB-DEST-GmDIAT se germinaron las plantas directamente en macetas con turba (sin pasar por crecimiento *in vitro*) y se rociaron con una solución de BASTA a 30 mg/L durante las primeras dos semanas de germinación. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas que las mencionadas anteriormente para cultivo de plantas en turba.

2. Bacterias y condiciones de crecimiento

2.1. *Escherichia coli*

Para la generación y propagación de construcciones génicas se utilizaron células competentes de la cepa Top10 de *Escherichia coli* (*E. coli*). Las bacterias fueron crecidas en medio Luria-Bertani (10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura) líquido o sólido (LB con agregado de agar 1,5 %) suplementado con un antibiótico para seleccionar las colonias transformadas con el plásmido de interés. Las bacterias fueron crecidas a 37 °C toda la noche. En el caso de los cultivos líquidos se utilizó agitación constante a 200 rpm.

2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de *Arabidopsis thaliana* se utilizó la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*). Las bacterias fueron crecidas en medio YEP (10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, 10 g/L de extracto de levadura) (Leth & McDonald, 2017) líquido o sólido (LB con agregado de agar 1,5 %) suplementado con rifampicina a 100 µg/mL y un antibiótico para seleccionar las colonias transformadas con el plásmido de interés. Las bacterias fueron crecidas a 28 °C, durante 48 horas. En el caso de los cultivos líquidos se utilizó agitación constante a 200 rpm.

3. Identificación de genes con homología a *OsDIAT*

3.1. Análisis filogenético

A partir de la secuencia de *OsDIAT* reportada por Shim *et al.*, 2023, se buscaron genes de alta homología de secuencia en el genoma de arroz (*Oryza sativa)*, soja y *Arabidopsis*. También se buscaron los genes reportados en *Arabidopsis* codificantes para enzimas BCATs (BCAT 1-6), y los genes descritos como BCATs. Para la búsqueda de genes se utilizó la base de datos online Phytozome (Goodstein *et al*., 2012).

La relación filogenética fue analizada usando la secuencia peptídica codificante de los genes seleccionados. Se realizó un alineamiento de secuencia ClustalW (Thompson *et al.,*1997), seguido del procesamiento con el algoritmo de "maximum likelihood method" utilizando el programa MEGA 11 (Tamura *et al.,* 2021).

3.2. Predicción de localización subcelular

El análisis *in silico* de la localización subcelular predicha de *OsDIAT*, de las proteínas de alta homología de secuencia con OsDIAT en arroz, soja y *Arabidopsis*, así como de las BCAT reportadas para *Arabidopsis* y soja fue realizado con la herramienta bioinformática WolfP-sort (Horton *et al.*, 2007).

3.3. Análisis de expresión de los genes con homología a *OsDIAT*

Se analizó *in silico* el perfil de expresión de *OsDIAT* (LOC_Os05g15530), de los genes de alta homología en soja (Glyma.12G226400, Glyma.17G190800 y Glyma.06G082700) y arroz (LOC_Os01g13690 y LOC_Os02g17330) durante el desarrollo y en condiciones de estrés abiótico, a partir de datos publicados en Genevestigator (Zimmermann *et al.,* 2004) y eFP Browser (Winter *et al.*, 2007). En Genvestigator se usó la herramienta "*Perturbation tool*" para analizar la expresión de los genes en respuesta a distintos estímulos, como el estrés por sequía y estrés salino. Se utilizó la herramienta eFP Browser para evaluar la expresión de los genes candidatos en condiciones de estrés, así como la expresión en las distintas partes de la planta durante su desarrollo.

También se analizó la expresión de los genes de soja (Glyma.12G226400, Glyma.17G190800 y Glyma.06G082700) en tres genotipos de soja con respuestas contrastantes al déficit hídrico (DM 6.2i, Génesis 5601 y PI 416537). Para ello, se esterilizaron y germinaron semillas de soja de los tres genotipos y se pasaron la plantas a macetas conteniendo una mezcla de turba y perlita en relación 3:1, de forma tal de que todas las macetas tuvieran la misma cantidad de sustrato. Se sembraron 13 plantas de cada genotipo. Las condiciones de crecimiento se describen en el Punto 1.1. Cuando las plantas llegaron al estadío V2-V3 se seleccionaron 5 plantas de cada genotipo para cada una de las condiciones del ensayo (déficit hídrico o condiciones control de crecimiento). Se hidrató el sustrato de las plantas por inmersión en una bandeja conteniendo agua destilada suplementada con 2 g/L de Hakaphos durante 2 días. Se dejaron escurrir las macetas, se

pesó cada una de ellas y se inició el ensayo de déficit hídrico. Las plantas de la condición control fueron regadas con agua destilada. Se recolectaron muestras de hojas de las plantas expuestas a déficit hídrico al llegar el sustrato a un contenido de agua del 25 %. En forma simultánea se recolectaron muestras de hojas de las plantas crecidas en condición control. Se hicieron tres mix tomando hojas de todas las plantas del mismo genotipo y condición.

Para las extracciones de ARN se utilizó el kit PureLink™ Plant RNA Reagent de Invitrogen (cat. no.12322012), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello se tomaron 100 mg de tejido aproximadamente de cada muestra y se molieron en un mortero con nitrógeno líquido previo a la extracción. La elución se realizó en 30 µl de agua RNAsa free y se almacenaron las extracciones a -80°C. Las extracciones de ARN fueron cuantificadas por espectrofotometría a 260 nm utilizando un Nanodrop. Se analizó la integridad del ARN mediante visualización en gel de agarosa al 2%. Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis de Thermo Scientific (cat. no. K1621), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para analizar la expresión de los genes se realizó una cuantificación relativa por qPCR. Para ellos se utilizó el kit SYBR Green PCR Kit de Quanti Nova Qiagen (cat. no. 208054), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron los cebadores F-Gly.06G082700(2) y R-Gly.06G082700(2) para amplificar el gen Glyma.06G082700; F-Gly.12G226400 y R-Gly.12G226400 para amplificar el gen Glyma.12G226400; F-Gly.17G190800 y R-Gly.17G190800 para amplificar el gen Glyma.17G190800. Como gen normalizador se utilizó un factor de elongación 1B (EF) (Gly02.G276600) reportado en Fleitas *et al.,* 2023, utilizando los siguientes cebadores F-Gly.02G276600 y R-Gly.02G276600 (Tabla. 1, Punto 3.3).

A partir de los resultados se calculó el $2^{-\Delta\Delta CT}$, siendo $\Delta\Delta CT = (CTgen\,candidato - CT\,EF)_{estrés} - (CTgen\,candidato - CTEF)_{control}$

Donde CT: *cycle threshold* y EF: Factor de elongación 1B. Los resultados se graficaron y analizaron en el programa Graphpad Prism 8.3.0. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey.

3.4. Predicción de elementos en *cis* en los promotores

Se realizó el análisis *in silico* de una región de 1000 pb del promotor de los genes con alta homología a *OsDIAT* en soja Glyma.12G226400, Glyma.17G190800 y Glyma.06G082700, para identificar posibles elementos en *cis* presentes en el genoma de referencia de soja (Williams 82). Para eso se tomaron 1000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de los tres genes de interés, y se utilizó la herramienta PlantPan 4.0 (Chow *et al.,* 2024) la cual identifica secuencias reconocidas por distintos motivos de factores de transcripción (ej, bZIP, MYB). Se contó la cantidad de elementos presentes en cada promotor, filtrando los datos de la siguiente manera: 1) En caso de haber más de una secuencia predicha para un mismo sitio del ADN, se contó solo la secuencia de mayor score. 2) En caso de haber un elemento en *cis* predicho en ambas hebras (secuencias palindrómicas) fueron contadas como dos sitios independientes. Se graficó la cantidad de

elementos en cada promotor en el programa Graphpad Prism 8.3.0. Además, se utilizó el programa Snap Gene Viewer para esquematizar la localización de los elementos dentro de cada secuencia promotora.

4. Generación de construcciones conteniendo el promotor de *GmDIAT*

Se extrajo ADN genómico a partir de hojas de los genotipos Génesis 5601 y PI 416537 utilizando el kit *Quick*-DNA Plant/Seed Miniprep Kit de Zymo Research (cat. num. D6020). Se amplificó un fragmento de ADN de 2400 pb upstream del sitio de inicio de la traducción del gen Glyma.12G226400 (*GmDIAT*). Para ello, se utilizó la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase de New England Biolabs, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usaron los cebadores FwpromDIAATSR3 y RvpromDIAATSR3 (Tabla. 4, Anexo). Se utilizó el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 98 °C por 5 minutos; 35 ciclos de: desnaturalización a 98 °C por 30 segundos, hibridación a 60°C por 10 segundos y extensión a 72 °C por 1,5 minutos; extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de amplificación fueron separados en una electroforesis en gel de agarosa al 1% para recortar la banda correspondiente al amplicón de interés. El amplicón fué recortado del gel y purificado utilizando el kit NucleoSpin Gel and PCR Cleanup Kit de Macherey- Nagel (cat. no. 740609.50), y fué clonado en el vector pJET1.2 blunt cloning vector, del Clone JET PCR Cloning Kit de Thermo Scientific (cat. num. K1231), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los clones resultantes fueron denominados pJET-promDIAAT(PI) y pJET-promDIAAT(Gen). La secuencia de los insertos fueron comparadas contra el genoma del genotipo de referencia Williams 82, utilizando la herramienta BLASTn en la plataforma Phytozome.

5. Generación de vectores de expresión del gen *GmDIAT*

5.1. Amplificación de la región codificante de *GmDIAT*

A partir de ARN total de hojas de plantas de soja expuestas a déficit hídrico, se sintetizó ADNc tal como se describe en el Punto 3.3 y se amplificó la región codificante de *GmDIAT* mediante PCR. Para ello, se utilizó la enzima Phusion™ High–Fidelity DNA Polymerase de Thermo Scientific (cat. no. F530L) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usaron dos juegos de cebadores: F-GmDIAT_ BamHI y R-GmDIAT_XhoI para amplificar la región codificante del gen *GmDIAT* conteniendo el codón de STOP de la transcripción (CDS-GmDIAT); y los cebadores F-GmDIAT_ BamHI y R-GmDIAT_NotI para amplificar la región codificante del gen sin el codón de STOP (CDS-GmDIATss). Todos los cebadores pueden observarse en la Tabla 4 (Anexo). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C por 30 segundos; 5 ciclos de: desnaturalización a 98 °C por 10 segundos, hibridación a 50 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto; 40 ciclos de: desnaturalización a 98 °C por 10 segundos, hibridación a 60 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto; extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de amplificación fueron separados en una electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia del amplicón de interés.

5.2. Clonado de la región codificante de *GmDIAT* en vector pENTR2B

Los productos de amplificación (CDS-GmDIAT y CDS-GmDIATss) fueron clonados en el vector pENTR2B (Fig. 30, anexo) utilizando enzimas de restricción. Para clonar el CDS-GmDIAT, se digirió dicho amplicón así como el vector de entrada pENTR2B con las enzimas BamHI y XhoI (New England Biolabs); mientras que para el clonado del amplicón CDS-GmDIATss se utilizaron las enzimas BamHI y NotI (New England Biolabs). Los vectores pENTR2B digeridos fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, de forma de separar la banda correspondiente al vector digerido y purificado utilizando el kit NucleoSpin Gel and PCR Cleanup Kit de Macherey- Nagel (cat. num. 740609.50). Los amplicones digeridos fueron purificados utilizando el mismo kit. La ligación del vector y el amplicón se realizó usando la enzima T4 DNA ligase de Thermo Scientific (cat.no. EL0011) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los productos de ligación se utilizaron para transformar células quimiocompetentes Top10 de *E. coli.* Los clones resistentes al medio de selección (Kanamicina) fueron cultivados y almacenados a -80 °C en glicerol 30 %. Los plásmidos pENTR2B-GmDIAT y pENTR2B-GmDIATss fueron purificados utilizando el Zippy plasmid Plasmid Miniprep Kit (num. cat. D4020) y el ADN fue almacenado a -20 °C.

5.3. Clonado en vectores de destino mediante recombinación LR de Gateway

Los vectores pENTR2B-GmDIAT y pENTR2B-GmDIATss fueron utilizados como insumo en reacciones de recombinación LR con vectores binarios de expresión del transgén *GmDIAT*. Para ello, el vector pENTR2B-GmDIAT fué recombinado con el vector destino pUB-DEST; y el vector pENTR2B-GmDIATss fue recombinado con el vector pK7FWG2,0, mediante la tecnología de recombinación LR de Gateway.

Los dos vectores de destino utilizados son vectores binarios para la transformación de plantas mediante *A. tumefaciens*. El vector pUB-DEST (Fig. 31, anexo) contiene la secuencia promotora procedente del gen de ubiquitina 10 de *Arabidopsis*, bajo el cual queda regulado el transgén, así como un gen de resistencia a espectinomicina que permite la selección *in planta*. El vector pK7FWG2,0 (Fig. 32, anexo) tiene un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), y contiene además un gen reportero *GFP:GUS*, que queda en fase con el gen de interés. Esto permite expresar la proteína de estudio fusionada a la proteína reportera, pudiendo observar la expresión de la proteína mediante microscopía de fluorescencia. Presenta también un gen de resistencia a Kanamicina que permite la selección de células transformantes *in planta*.

Estos vectores se utilizaron para transformar cepas Top10 de *E. coli*, a partir de las cuales se purificaron los vectores de expresión pUB-DEST-GmDIAT y pK7FWG2,0-GmDIAT utilizando el Zippy Plasmid miniprep kit de Zymo Research (cat. no. D4020). Se almacenaron los plásmidos a -20 °C.

Todos los plásmidos generados fueron secuenciados en Macrogen para corroborar la presencia del *GmDIAT* y su correcta inserción en los vectores.

6. Generación de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas sobre-expresantes de *GmDIAT*

6.1. Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión floral

Para la obtención de plantas de *Arabidopsis* transgénicas con sobre-expresión de *GmDIAT* se utilizó el método de transformación por *Agrobacterium tumefaciens* mediante inmersión floral (*floral dip*) (Clough *et al.,*1998).

Para ello se transformaron células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) con los vectores de expresión pUB-DEST-GmDIAT y pK7FWG2,0-GmDIAT descritos en el Punto 5.3.

Se utilizaron entre 5 y 10 plantas de *Arabidopsis* por cada construcción, crecidas en condiciones normales de crecimiento. Se dejaron crecer hasta la etapa de floración, en la cual se les cortaron las inflorescencias primarias para favorecer el surgimiento de nuevas inflorescencias. Una vez que las plantas desarrollaron un buen número de botones florales, se realizó la infección de las flores con cepas de Agrobacterium conteniendo los vectores binarios pUB-DEST-GmDIAT o pK7FWG2,0-GmDIAT. Para la transformación se prepararon cultivos líquidos de las bacterias, que fueron decantados por centrifugación a 2000 x g durante 20 minutos y se resuspendidos en 500 mL de medio MS ½ suplementado con sacarosa al 5 % y Silwett-L77 al 0.05 %. Las flores fueron sumergidas en dichas soluciones por unos segundos y luego se dejaron crecer las plantas en condiciones normales de crecimiento. Los botones florales emergentes en los días posteriores fueron inoculados con la suspensión bacteriana en forma individual.

Las plantas transgénicas fueron seleccionadas utilizando antibióticos, tal como se describe en el Punto 1.2. De esta manera se obtuvieron líneas estables de *Arabidopsis* transgénicas expresando el gen *GmDIAT* en forma constitutiva, nombradas aquí *Arabidopsis* pUB-DEST-GmDIAT y pK7FWG2,0-GmDIAT en función de los vectores utilizados para la transformación de las plantas (pUB-DEST-GmDIAT y pK7FWG2,0-GmDIAT respectivamente).

6.2. Genotipado de las líneas transgénicas

Se analizó la presencia del transgén *GmDIAT* en plantas de *Arabidopsis* transformadas con los vectores pUB-DEST-GmDIAT y pK7FWG2,0-GmDIAT. Para ello se crecieron las plantas en selección tal como se describe en el Punto 1.2, y se determinó la presencia de la construcción génica en el genoma de la planta, mediante amplificación por PCR de regiones del gen *GmDIAT* presentes en la construcción génica. Se utilizó la enzima NucleoTypeR HotStart PCR Master Mix de Macherey-Nagel (cat. no.743202.100), siguiendo las

recomendaciones del fabricante. Para las líneas pK7FWG2,0-GmDIAT de la generación T2 se utilizaron los cebadores F-GmDIAT_rtpcr y R-GmDIAT_rtpcr (536 pb), y para las líneas pUB-DEST-GmDIAT se usaron los cebadores F-GmDIAT_BamHI y R-GmDIAT_XhoI (1052 pb) que se muestran en la Tabla 4 (Anexo). Como control negativo se utilizaron plantas WT y como control positivo se tomaron los vectores utilizados para la transformación de las plantas transgénicas. Se usó el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 minutos; 40 ciclos de: desnaturalización a 98 °C por 30 segundos, hibridación a 54 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto; extensión final a 72 °C por 1 minuto. Los productos de PCR se corrieron en electroforesis en gel de agarosa 1 %.

7. Expresión de las líneas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT*

Para analizar la expresión heteróloga de *GmDIAT* en las plantas de *Arabidopsis* transgénicas pUB-DEST-GmDIAT (líneas OE1, OE2, OE5 y OE8), se utilizó el método de RT-qPCR. Se extrajo ARN total a partir de cada una de las líneas identificadas. Para ello, se esterilizaron y germinaron semillas de todas las líneas tal como se describe en el Punto 1.2. Se tomaron 100 mg de hojas de plantas crecidas entre 6-8 semanas. Se molieron las muestras en nitrógeno líquido y se realizó la extracción de ARN usando el PureLink™ Plant RNA Reagent de Invitrogen (cat. no.12322012). El ARN total fue eluido en un volumen de 30 µl de agua RNAsa free y las extracciones se almacenaron a -80 °C. El ARN fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm utilizando un Nanodrop. Se analizó la integridad de la extracción mediante visualización en gel de agarosa al 2%. Para la síntesis de ANDc se utilizó el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermo Scientific (cat. no.K1621), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para analizar la expresión de *GmDIAT* se realizó una cuantificación relativa por qPCR utilizando el SYBR Green PCR Kit de Quanti Nova Qiagen (cat. no. 208054), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usaron los cebadores F-Gly.12G226400 y R-Gly.12G226400 para amplificar el transgén, y los cebadores F-AtAct2_qPCR y R-AtAct2_qPCR para amplificar el gen de actina AT3G18780, utilizado como gen normalizador. A partir de los resultados se calculó el $2^{-\Delta CT}$ para cada línea transgénica, siendo $\Delta CT = CT_{GmDIAT} - CT_{Actina}$,donde CT:*cycle threshold.* Los resultados fueron representados graficamente utilizando el programa Graphpad Prism 8.3.0.

8. Cuantificación de BCAAs en las líneas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT*

Se utilizaron plantas de las líneas OE1, OE2, OE5 y OE8 de *Arabidopsis* pUB-DEST-GmDIAT, así como plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestre Col-0 (WT). Se sembraron semillas en bandejas conteniendo turba como sustrato y se crecieron en las condiciones mencionadas en el Punto 1.2, y fueron seleccionadas mediante asperjado con BASTA 30 mg/L. Las muestras de hojas fueron tomadas a las 6 semanas de crecimiento de las plantas. Se hicieron entre 2 mix de hojas tomando muestras de 5 plantas para cada uno.

Se congelaron las muestras en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C. Se liofilizaron las muestras a < 80 Pa, -40 °C durante 48 h, se molió el tejido en mortero utilizando nitrógeno líquido y se almacenaron las muestras a -80 °C.

La cuantificación de BCAAs en plantas *Arabidopsis* se realizó por HPLC-FLD después del etiquetado con o-ftalaldehído (OPA), de acuerdo con el método de Dai *et al.,* 2014 y Zheng *et al.,* 2017, con algunas modificaciones. Se utilizaron 100 mg de cada muestra molida en ácido trifluoroacético (TFA: *thryfluoroacetic acid*) al 5% v/v. Los BCAAs fueron extraídos en un baño de ultrasonido. Las muestras fueron centrifugadas a 18000 rpm por 20 min a 4°C. Se derivatizaron 100 µL de cada extracción de aminoácidos, así como de los estándares analíticos y blancos utilizando OPA y n-acetil-cisteína. Cada solución fue filtrada utilizando jeringas con filtro de 0,22 µm, y se inyectaron en el equipo de HPLC.

La cuantificación de BCAAs fue realizada utilizando curvas de calibración hechas con estándares certificados de la empresa Sigma-Aldrich. Las condiciones del análisis fueron optimizadas para las muestras de plantas de soja o *Arabidopsis* dependiendo el origen de las muestras en función de la especie vegetal. La precisión, el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ) y la veracidad (% de recuperación de muestras enriquecidas) fueron determinados para cada aminoácido según la Guía Eurachem (Magnusson, 2014).

Los datos obtenidos fueron graficados y analizados en el programa Graphpad Prism 8.3.0. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey.

9. Localización subcelular de GmDIAT

Para la visualización de la proteína quimérica GmDIAT:GPF en plantas de *Arabidopsis* pK7FWG2,0-GmDIAT se utilizaron plantas de la línea OE1. Se usó un microscopio confocal de fluorescencia ZEISS 800. Se visualizó la fluorescencia intrínseca de los cloroplastos, y la fluorescencia de la proteína reportera GFP utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de detección de 510 nm.

Como muestra de partida se utilizaron hojas de plantas pK7FWG2,0-GmDIAT de la línea OE1, o protoplastos generados a partir de las mismas.

Para la generación de protoplastos se utilizó el protocolo de Yoo *et al.,*2007 con algunas modificaciones. Brevemente, se cortaron 10 hojas frescas en tiras pequeñas y se transfirieron inmediatamente a 10 ml de solución de digestión (celulosa R10 al 1 %, macerozima R10 al 0,5%, manitol 0,4 M, ácido 4-morfolinoetanosulfónico (MES) 20 mM, pH 5,7, KCl 10 mM, CaCl2 10 mM, BSA al 0,1% y β-mercaptoetanol al 0,035 %). Las tiras de hojas se infiltraron al vacío durante 30 min en la oscuridad usando una bomba de vacío y se digirieron durante 1 h con agitación baja. Los demás pasos se siguieron como describen Yoo *et al.,* 2007. Los protoplastos se re-suspendieron en solución de WI (MES 4 mM, pH 5,7, manitol 0,5 M, KCl 20 mM). Se montaron entre porta y cubre objetos en el momento de hacer la visualización.

10. Fenotipado de las líneas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT*

10.1. Ensayos de germinación *in vitro*

Se esterilizaron semillas de las líneas OE1 y OE5 de las *Arabidopsis* transgénicas pUB-DEST-GmDIAT, así como semillas de *Arabidopsis* silvestre Col-0 (WT) y se estratificaron 2 días en heladera, tal como se detalla en el Punto 1.2. Se sembraron 58 semillas de cada línea (OE1 y OE5) y 58 semillas WT en placas de Petri conteniendo MS ½ pH 5,7 0,85% agar; y en placas adicionadas con NaCl 100 mM o Manitol 250 mM. Se hicieron 3 placas por condición. Se dejaron crecer en cámara de cultivo *in vitro* en las condiciones mencionadas en el Punto 1.2, y al día 4 de incubación se contaron las plantas germinadas. El ensayo se realizó por triplicado. A partir de dichos datos se graficó el porcentaje de germinación de cada genotipo en estrés (NaCl 100 mM o Manitol 250 mM) en función de la germinación en condición control (MS ½); y se realizó un análisis estadístico de los datos mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey. Para ello se utilizó el programa Graphpad Prism 8.3.0.

10.2. Ensayos de crecimiento *in vitro*

Se esterilizaron y sembraron semillas OE1, OE5 de plantas de Arabidopsis pUB-DEST-GmDIAT y plantas WT en placas de Petri conteniendo medio MS ½ pH 5,7 0,7% agar. Se dejaron estratificar 2 días en heladera a 4 °C, y luego se pasaron las placas a 24 °C. A los 6 días, se pasaron las plántulas a placas de MS ½ pH 5,7 0,85% agar, y a placas adicionadas con NaCl 100 mM o Manitol 250 mM. Las plántulas se colocaron de manera vertical, recostadas sobre el medio de cultivo para evaluar el crecimiento de la raíz. En cada placa se colocaron 10 plantas de una línea OE (OE1 o OE5) y 10 plantas WT. Se utilizaron 2 placas de cada línea por condición de crecimiento. Se midió el crecimiento de la raíz al día 5 posterior al pasaje de las plántulas. Además, se evaluó el contenido de agua y peso seco de las plantas el día 11.

Los datos obtenidos fueron graficados y analizados en el programa Graphpad Prism 8.3.0. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey.

10.3. Ensayos de déficit hídrico en tierra

Se realizaron tres ensayos para evaluar la cinética de deshidratación y parámetros fotosintéticos de las plantas de *Arabidopsis* pUB-DEST-GmDIAT expuestas a condiciones de déficit hídrico. Para ello se utilizaron las líneas OE1 y OE5 de *Arabidopsis* pUB-DEST-GmDIAT, así como plantas WT. Las plantas fueron germinadas en macetas con turba y raleadas para dejar una única planta por maceta. Tanto el crecimiento de las plantas como el ensayo de déficit hídrico fueron realizados en condiciones de 8/16 hs de luz, 120

µmol m^{-2} s^{-1}, 24 °C. Para el ensayo se utilizaron 8-10 plantas de 4-5 semanas por genotipo por condición, dispuestas en forma randomizada en la gradilla tal como se muestra en la Fig. 20. Se dejaron deshidratar las plantas hasta un 4-13 % de contenido de agua, momento en el cual se comenzaron a rehidratar (durante 6 días). Se evaluó la sobrevida de las plantas al día 6 de rehidratación. Se calculó el contenido de agua del sustrato a lo largo del tiempo a través de medidas del peso de las macetas y se utilizó un PAM (*Pulse Amplitude Modulation*) para evaluar el parámetro fotosintético Fv/Fm a lo largo del tiempo.

También se realizó un ensayo con un mayor número de plantas para evaluar la sobrevida y el rendimiento en semilla de las plantas de *Arabidopsis* pUB-DEST-DIAT expuestas a condiciones de déficit hídrico. Para ello se utilizaron las líneas OE1 y OE5 de *Arabidopsis* pUB-DEST-GmDIAT, así como plantas WT. Las semillas fueron germinadas en macetas con turba y raleadas para dejar una única planta por maceta. El ensayo se llevó a cabo en condiciones controladas (8 hs de luz, 120 µmol m-2 s-1, 24 °C) utilizando 48 plantas por genotipo y condición, distribuidas aleatoriamente (Fig. 21). Las plantas se deshidrataron hasta un 12% de contenido de agua (20 días) y luego se comenzaron a rehidratar. Se evaluó el contenido de agua del sustrato a lo largo del tiempo a través de medidas del peso de las macetas. Se tomaron muestras de hojas al día 10, 18 y 19 de déficit hídrico para evaluar el contenido de superóxido, peróxido de hidrógeno, el estado de peroxidación lipídica y el contenido de clorofila. Se determinó la sobrevida de las plantas al día 6 post-rehidratación y las plantas sobrevivientes se dejaron semillar para calcular el rendimiento de las líneas en función del peso de las semillas cosechadas.

Para visualizar la acumulación de superóxido se realizaron tinciones con NBT (*Nitroblue Tetrazolium*) con la metodología propuesta por Trujillo *et al.,* 2004. Para ello se tomaron discos de hojas de plantas OE1, OE5 y WT crecidas en condiciones control de crecimiento y condiciones de déficit hídrico tomadas al día 10 (WC 30%) y 18 de déficit hídrico (WC 15%). Se incubaron 2 h en buffer de fosfato de potasio pH 7,8 (1 mg/mL NBT, 10 nM NaN3) en condiciones de vacío. Se realizaron dos lavados con H2O y luego lavados con EtOH al 30% y 70%, y se dejaron toda la noche en EtOH al 95%. Se tomaron fotografías con un estereomicroscopio Axio Zoom V16 (Zeiss).

Para evaluar la acumulación de peróxido de hidrógeno se realizaron tinciones con DAB (diaminobencidina) de acuerdo al protocolo de Lucena *et al.,* 2003. Para ello se utilizaron discos de hojas de plantas OE1, OE5 y WT crecidas en condiciones control de crecimiento y condiciones de déficit hídrico tomadas al día 18 de déficit hídrico (WC 15%). Se incubaron los discos en una solución con DAB (DAB 1 mg/mL, Hcl pH 8,3) o una solución blanco (sin DAB) y se incubaron en vacío por unos minutos. Se realizaron dos lavados con H_2O y luego lavados con EtOH al 30% y 70%, y se dejaron toda la noche en EtOH al 95%. Se tomaron fotografías con un estereomicroscopio Axio Zoom V16 (Zeiss).

Para evaluar la peroxidación lipídica se utilizó el reactivo de Schiff de Thermo Scientific (cat. num. 84655). Para ello se utilizaron discos de hojas de plantas OE1, OE5 y WT crecidas en condiciones control de crecimiento y condiciones de déficit hídrico tomadas al día 19 de déficit hídrico (WC 13%). Se incubaron los discos con el reactivo de Schiff durante 1 h, se lavaron con H_2O, se incubaron en EtOH a 95 °C por 60 minutos y se volvieron a lavar con H_2O. Se tomaron fotografías con un estereomicroscopio Axio Zoom V16 (Zeiss).

Se evaluó el contenido de clorofila de las plantas en función de su peso fresco y seco siguiendo la metodología de Wolken & Schwertz, 1953. Para ello, discos de hojas de plantas OE1, OE5 y WT crecidas en condiciones control así como en condiciones de déficit hídrico fueron tomadas al día 18 de déficit hídrico (WC 15%). Se incubaron en 1 mL de acetona al 80% (v/v). Se centrifugaron las muestras y se midió la absorbancia del sobrenadante a 645 y 663 nm usando un espectrofotómetro. Se calculó el contenido de clorofila A y B utilizando las siguientes ecuaciones:

$$Clorofila\ A\ (mg/g) = (12,7\ x\ A_{663} - 2,697\ x\ A_{645})\ x\ V/(W)$$

$$Clorofila\ B\ (mg/g) = (22,77\ x\ A_{645} - 4,687\ x\ A_{663})\ x\ V/(W)$$

Siendo mg/g: los mg de clorofila por mg de tejido; V: el volumen de acetona utilizado; y W: el peso del tejido en g.

Los datos obtenidos en los tres ensayos fueron graficados en el programa Graphpad Prism 8.3.0. Para el análisis de rendimiento de las líneas, así como para la evaluación del contenido de clorofila se realizó un análisis estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey.

11. Expresión de *TOR* en *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT*

Se analizó la expresión de *TOR* (AT1G50030) en las líneas OE1, OE2, OE5, OE8 de *Arabidopsis* transgénicas sobre-expresantes del gen *GmDIAT* generadas con el vector pUB-DEST-GmDIAT, así como en plantas WT. La extracción de ARN y síntesis de ADNc se encuentra descrito en el Punto 7.

Se realizó una cuantificación relativa por qPCR utilizando el *SYBR Green PCR Kit* de Quanti Nova Qiagen (cat. no. 208054), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usaron los cebadores Fw-AtTOR y Rv-AtTOR para amplificar el gen, y los cebadores F-AtAct2_qPCR y R-AtAct2_qPCR para amplificar el gen de actina AT3G18780, utilizado como gen normalizador. A partir de los resultados se calculó el $2^{-\Delta CT}$ para cada línea transgénica, siendo $\Delta CT = CT_{TOR} - CT_{Actina}$, donde CT: *cycle threshold*. Los resultados se graficaron en el programa Graphpad Prism 8.3.0. Se realizó un análisis estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey.

Resultados

Identificación de genes ortólogos de *OsDIAT* presentes en el genoma de soja

1. Búsqueda de proteínas con homología a OsDIAT

Con el objetivo de identificar posibles ortólogos de *OsDIAT* en soja, se realizó una búsqueda de genes con alta homología de secuencia en las proteínas deducidas, utilizando la proteína codificada por *OsDIAT* (LOC_Os05g15530) como referencia. Para ello, se utilizó la secuencia aminoacídica de OsDIAT en la base de datos Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/) para identificar proteínas homólogas en el genoma de soja, arroz y *Arabidopsis*.

A partir de esta búsqueda se identificaron tres genes con alta homología de secuencia con *OsDIAT* en soja: Glyma.06G082700, Glyma.12G226400 y Glyma.17G190800; dos genes en arroz: LOC_Os01g13690 y LOC_Os02g17330; y tres en *Arabidospsis:* AT5G57850, AT3G05190 y AT5G27410. Además se incluyeron las seis BCATs reportadas para *Arabidopsis*: AT1G10060 (BCAT1), AT1G10070 (BCAT2), AT3G49680 (BCAT3), AT3G19710 (BCAT4), AT5G65780 (BCAT5) y AT1G50110 (BCAT6); así como las proteínas descritas como BCATs en soja en Phytozome: Glyma.08G063300, Glyma.08G063000, Glyma.04G049200, Glyma.11G045300, Glyma.01G196300, Glyma.07G186000, Glyma.07G186100 y Glyma.06G050100.

La relación filogenética entre *OsDIAT*, los genes de alta homología encontrados en soja, arroz, *Arabidopsis* y los genes codificantes a BCATs en *Arabidopsis*, y soja fue analizada mediante un alineamiento de secuencias utilizando ClustalW (Thompson *et al.,*1997), seguido del procesamiento con el método de máxima verosimilitud "*maximum likelihood method*" usando el programa MEGA 11 (Tamura *et al.,* 2021).

Dado que se ha asociado la localización subcelular de las BCAT con su participación en la síntesis o degradación de BCAAs, se realizó un análisis *in silico* de la localización subcelular de las proteínas utilizando la herramienta bioinformática WolfP-sort (Punto 3.2).

En la Fig. 6 puede observarse un árbol filogenético con los genes homólogos a OsDIAT en arroz, soja y *Arabidopsis*, así com las BCATs reportadas en *Arabidopsis* y las proteínas descritas como BCATs en soja en el programa Phytozome. La localización subcelular predicha para cada proteína se encuentra junto a su número de acceso. En el caso de las BCATs de *Arabidopsis* se utilizó la localización reportada en la bibliografía. La comparación entre la localización predicha por WolfP-sort y la reportada en la bibliografía para las BCATs se observa en la Tabla 1.

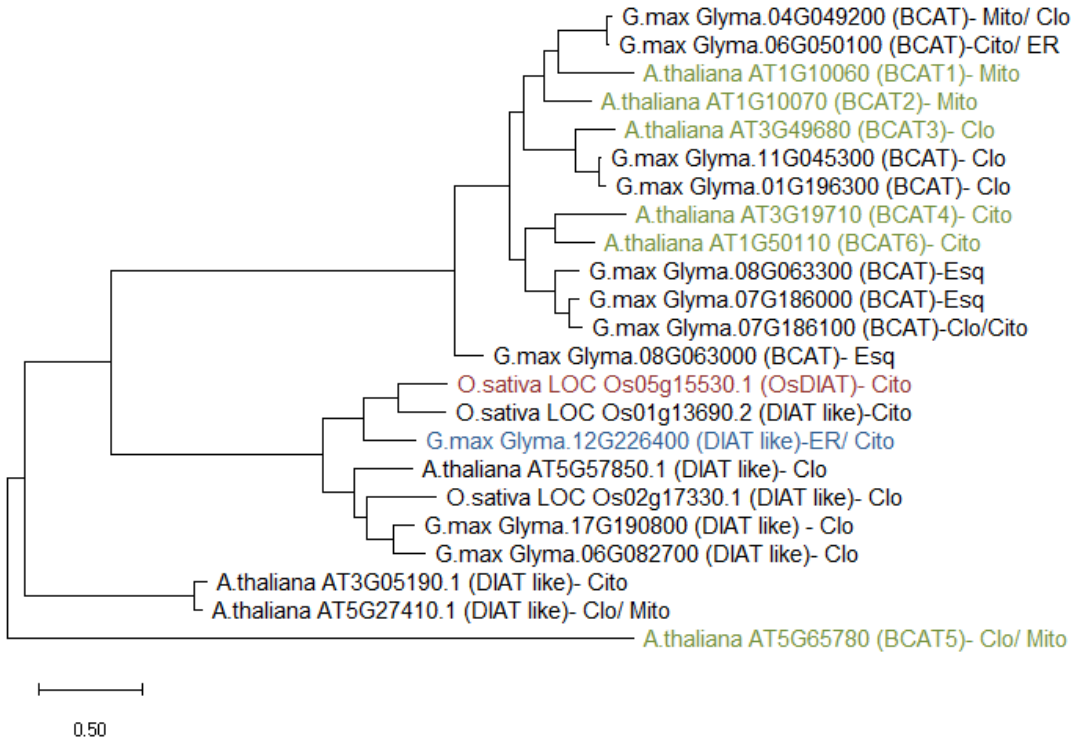


Figura 6. Análisis filogenético de los genes de alta homología a *OsDIAT* y proteínas BCATs. Se utilizaron las secuencias peptídicas de *OsDIAT*, así como de los genes de alta homología a *OsDIAT* en soja, arroz y Arabidopsis (DIAT like) , y los genes codificantes a BCAT de *Arabidopsis* y soja (BCAT), cada uno identificado con su número de acceso. Se alinearon las secuencias mediante CLUSTAL W y se construyó el árbol filogenético por "*maximum likelihood method*" utilizando el programa MEGA 11 (Tamura *et al*., 2021). El largo de las ramas representa la distancia filogenética. Las BCATs de *Arabidopsis* están en verde; *OsDIAT* en rojo y *GmDIAT* (Glyma.12G226400) en azul. Cada proteína tiene la localización subcelular predicha por la base de datos WolfPSort. Cito: citoplasmática; clo: cloroplástica; mito: mitocondrial; esq: citoesquelética; ER: de retículo endoplasmático. La localización subcelular de las BCATs de *Arabidopsis* es la reportada en la bibliografía.

En la Fig. 6 se puede observar que tanto el gen *OsDIAT* como las proteínas de alta homología a *OsDIAT* se encuentran separadas filogenéticamente de las BCATs reportadas en *Arabidopsis* y proteínas clasificadas como BCATs en soja, observándose dos grupos diferentes: uno con las proteínas homólogas a OsDIAT (DIAT-like) y otro con las BCATs de Arabidopsis y soja (BCATs), con la excepción de la BCAT5 de *Arabidopsis* que se encuentra separada de los dos grupos mencionados. El gen de soja que mostró una mayor homología de secuencia y una mayor cercanía filogenética con OsDIAT es Glyma.12G226400.

También se puede observar que las proteínas tienden a agruparse en base a su localización subcelular predicha, estando las BCATs cloroplásticas y mitocondriales en dos grupos separados y más cercanos entre sí que con el grupo de BCATs de localización predicha citoplasmática. Lo mismo parece observarse en el grupo de proteínas de alta homología a OsDIAT.

Tabla 1. Localización subcelular predicha y reportada para las proteínas BCATs y homólogas a OsDIAT. Localización subcelular predicha por la base de datos WolfPSort y localización reportada en la bibliografía para las BCATs de *Arabidopsis*, OsDIAT y las proteínas de alta homología a OsDIAT en soja. Cito: citoplasmática; clo: cloroplástica; nuc: nucleica; mito: mitocondrial; esq: citoesquelética; per:peroxisoma; ER: de retículo endoplasmático; vac: vacuolar; extr: extracelular; plas:membrana plasmática.

Proteína	Número de acceso	Localización predicha	Localización reportada
BCAT Arabidopsis	**AT1G10060 (BCAT1)**	clo: 12, mito: 2	mito
	AT1G10070 (BCAT2)	clo: 8, mito: 6	mito
	AT3G49680 (BCAT3)	clo: 8, mito: 6	clo
	AT3G19710 (BCAT4)	cito: 11, clo: 2, esq: 1	cito
	AT5G65780 (BCAT5)	clo: 10, nucl: 3, esq: 1	clo/mito
	AT1G50110 (BCAT6)	cito: 6, nuc: 3, clo: 2, per: 2, esq: 1	cito
OsDIAT Arroz	**LOC_Os05g15530**	cito: 7.5, cito_nuc: 5.5, nuc: 2.5, clo: 1, plas: 1, esq: 1, ER._vac: 1	cito
DIAT like Soja	**Glyma.12G226400**	ER.: 4.5, ER_plas: 4, cito: 3, plas: 2.5, mito: 2, clo: 1, nuc: 1	-
	Glyma.17G190800	clo: 12, nuc: 2	-
	Glyma.06G082700	clo: 9, extr: 2, cito: 1, mito: 1, ER_vac: 1	-

En la Tabla 1 se puede observar que localización predicha para las BCAT de Arabidopsis concuerda con lo reportado en la bibliografía (Diebold *et al.,* 2002, Binder 2010; Angelovici *et al.*, 2013; Huang & Jander, 2017), a excepción de BCAT1 cuya localización predicha es cloroplástica y se ha reportado de localización mitocondrial. La localización subcelular predicha para OsDIAT es citosólica, lo cual concuerda con lo reportado en la bibliografía (Shim *et al.,* 2023), y Glyma.12G226400 es la única proteína de soja que comparte localización predicha citoplasmática con OsDIAT.

En base al análisis filogenético y la localización subcelular predicha se propone que Glyma.12G226400 podría ser una proteína con homología funcional al *OsDIAT* en soja.

2. Expresión de los genes durante el desarrollo y en condiciones de estrés

Con el fin de profundizar en el conocimiento a nivel funcional de los genes de alta homología a *OsDIAT* de soja (Glyma.12G226400, Glyma.06G082700 y Glyma.17G190800) se realizaron análisis de expresión génica, tanto *in silico* como experimentales, en condiciones de estrés abiótico así como durante el desarrollo.

Para los análisis *in silico* se utilizaron datos de RNA-seq obtenidos en trabajos previos (datos no publicados), a partir de tres genotipos de soja con respuestas contrastantes a la sequía, crecidas en condiciones control y condiciones de déficit hídrico (Punto 1.1). Los genotipos analizados fueron Leo1706, TJS2049 y SO7-6557, aportados por el programa de Mejoramiento Genético de soja de INIA La Estanzuela. En este análisis pudimos observar que de los tres genes analizados, únicamente Glyma.12G226400 mostró una clara inducción frente condiciones de estrés por déficit hídrico respecto a la condiciones control, siendo mayor su expresión en el genotipo Leo1706.

A su vez, se realizó una búsqueda de datos de expresión en la base de datos de Genvestigator (https://genevestigator.com/) a fin de la analizar la expresión de los genes de interés, de acuerdo a datos públicos de expresión génica en soja obtenidos a partir de experimentos en diversos genotipos y condiciones de estrés abiótico (Fig. 7). También evaluamos la expresión de los genes de interés y del gen *OsDIAT* a lo largo del desarrollo y en condiciones de déficit hídrico, utilizando la herramienta eFP Browser (https://bar.utoronto.ca/) (Fig. 8).

Los estudios de expresión *in silico* mostraron que el gen Glyma.12G226400 fue el único de los tres genes analizados en soja que se induce frente a condiciones de déficit hídrico y estrés salino (Fig. 7), alcanzando valores de fold change de entre 2,69 y 4,08. Estos resultados concuerdan con los valores de experimentos de RNA-seq obtenidos previamente por nuestro grupo (Datos no publicados).

Por otro lado, la expresión génica a lo largo del desarrollo varía entre los tres genes analizados. Glyma.12G226400 se expresa principalmente a nivel de las raíces y en menor medida en las vainas verdes; Glyma.06G082700 se expresa principalmente en las hojas y las vainas verdes, aunque su expresión es muy baja; y Glyma.17G190800 se expresa en toda la planta y en las diferentes fases del desarrollo con una expresión intermedia (Fig. 8 A).

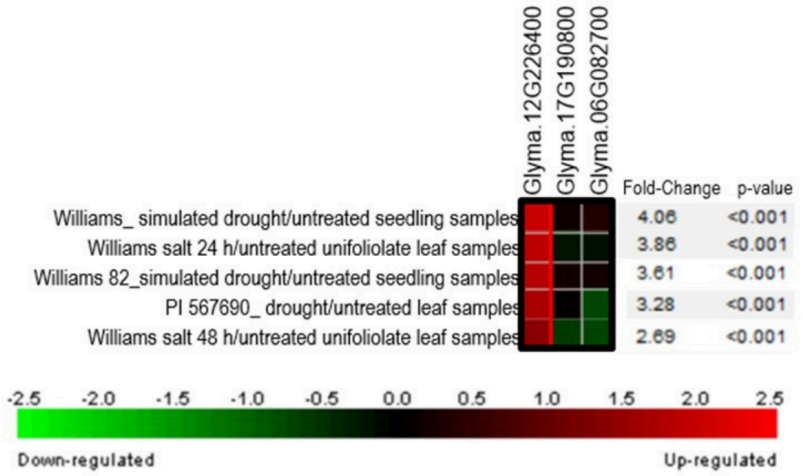


Figura 7. Análisis de expresión de los genes de soja de alta homología a *OsDIAT* bajo condiciones de estrés abiótico. Comparación de los niveles de expresión de los tres genes de soja (Glyma.06G082700, Glyma.17G190800 y Glyma.12G226400) en condiciones de déficit hídrico y estrés salino. Se utilizó la herramienta "*Perturbation tool*" para buscar datos de microarreglos y

RNA-seq de Genevestigator. Se pueden observar los valores de *fold change* y *P-values* para cada uno de los genes en las distintas condiciones. Los genes que se encuentran sobre-expresados en cada condición se encuentran en rojo, mientras que los genes reprimidos se muestran en verde.

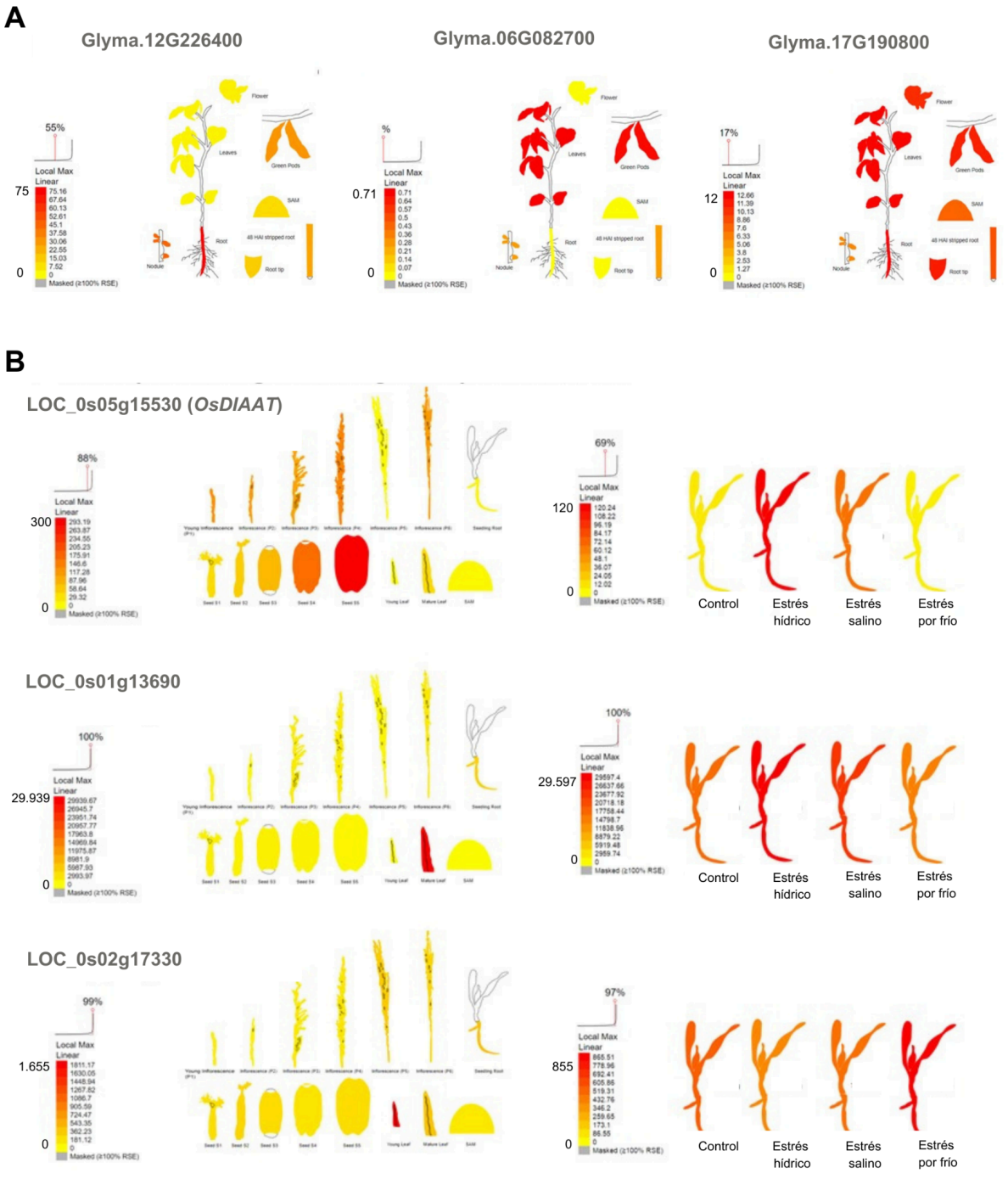


Figura 8. Análisis de expresión de los genes de alta homología a *OsDIAT* en soja y arroz durante el desarrollo y condiciones de estrés abiótico. A. Expresión de los tres genes de soja (Glyma.06G082700, Glyma.12G226400 y Glyma.17G190800) durante el desarrollo. **B.** Expresión de los tres genes de arroz (LOC_Os05g15530 (*OsDIAT*), LOC_Os01g13690 y LOC_Os02g17330) durante el desarrollo (izquierda) y en condiciones de estrés abiótico (derecha). Se utilizó el buscador eFP Browser. En rojo se representan mayores niveles de expresión, en amarillo menores niveles de expresión. A la izquierda de cada escala se muestra el máximo y mínimo de cada escala colorimétrica.

En arroz, el gen *OsDIAT* (LOC_Os05g15530) y los otros dos genes homólogos (LOC_Os01g13690 y LOC_Os02g17330) mostraron un patrón de una expresión génica diferencial, tanto en el desarrollo como en respuesta a condiciones de estrés abiótico (Fig. 8 B). En particular, *OsDIAT* es el único gen de estos tres que muestra una alta expresión en semillas, así como una clara inducción a nivel de tejido vegetativo frente a condiciones de déficit hídrico y en menor medida, estrés salino.

En base a estos análisis *in silico*, se puede concluir que dentro de cada especie, los genes Glyma.12G226400 y *OsDIAT* son los que exhiben mayores niveles de inducción frente a condiciones de déficit hídrico, en comparación con el resto de genes de alta homología de secuencia con *OsDIAT*.

En un ensayo previo del laboratorio (no publicado) se analizó el contenido de BCAAs en tres genotipos de soja contrastantes en cuanto a su fenotipo frente a la sequía, y se observó que el genotipo que presenta un fenotipo más tolerante a las condiciones de estrés (PI 416537) es aquel que acumula una mayor cantidad de BCAAs, lo cual va en concordancia con varios estudios en los cuales se ha vinculado la acumulación de BCAAs con la tolerancia de las plantas al déficit hídrico y otras condiciones de estrés abiótico.

Teniendo en cuenta esta información, nos propusimos evaluar si los genes Glyma.06G082700, Glyma.12G226400 y Glyma.17G190800, podrían estar vinculados a la acumulación diferencial de BCAAs en estos genotipos de soja con respuestas contrastantes al déficit hídrico (PI 416537, Génesis 5601 y DM 6.2i). Para ello analizamos la expresión de los 3 genes en los 3 genotipos de soja crecida en condiciones de déficit hídrico y condición control, tal como se describe en el Punto 3.3. Brevemente, se crecieron plantas de los tres genotipos, un grupo de plantas se dejó deshidratar y el otro se mantuvo en condiciones control de crecimiento, y se tomaron muestras de hojas al llegar el sustrato a un contenido de agua del 25%. Se extrajo ARN a partir de muestras de hojas y se cuantificó la expresión relativa de los genes mediante qPCR. Los cebadores utilizados pueden observarse en la Tabla 4 (Anexo). A partir de los datos obtenidos se calculó el $2^{-\Delta CT}$ para cada gen candidato en cada genotipo y condición de crecimiento, siendo $\Delta CT = CT gen\ candidato - CT gen\ de\ referncia.$ También se graficó el $2^{-\Delta\Delta CT}$ para cada gen candidato, siendo $\Delta\Delta CT = \Delta CT estrés - \Delta CT control.$ Los resultados pueden observarse en la Fig. 9.

En la Fig. 9 A puede observarse que los genes Glyma.12G226400 y Glyma.17G190800 se expresan en forma similar en plantas de soja crecidas en condiciones control de crecimiento. El gen Glyma.06G082700 presenta menores niveles de expresión en los tres genotipos de soja. El único gen que aumenta su expresión en condiciones de déficit hídrico es el Glyma.12G226400 (Fig 9 B), y lo hace con un fold change de 2 (Fig 9 C). Este resultado concuerda con lo observado en el análisis *in silico* de la expresión de estos genes (Fig 7).

En base a los resultados obtenidos en este ensayo podemos decir que Glyma.12G226400 se induce en plantas de soja sometidas a condiciones de déficit hídrico, y que dicho aumento es similar en los tres genotipos de soja analizados, siendo el genotipo Génesis 5601 aquel de mayor expresión, tanto en condiciones control como condiciones de déficit hídrico.

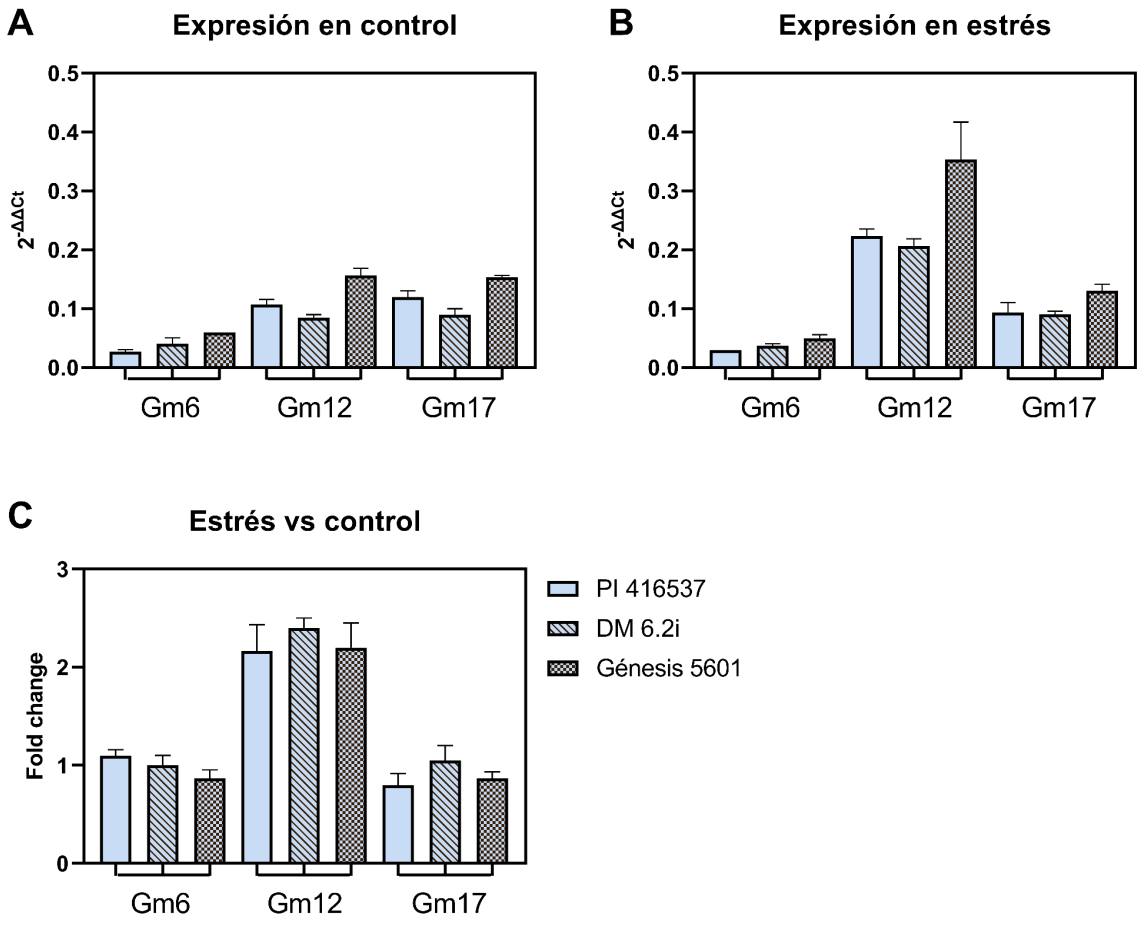


Figura 9. Expresión de los genes de alta homología a *OsDIAT* en genotipos contrastantes de soja. Análisis de expresión de Glyma.06G082700 (Gm6), Glyma.12G226400 (Gm12) y Glyma.17G190800 (Gm17), en los genotipos de soja PI 416537, Génesis 5601 y DM 6.2i mediante qPCR. Se utilizaron los cebadores F-Gly.06G082700(2) y R-Gly.06G082700(2) para amplificar el Gm6; F-Gly.12G226400 y R-Gly.12G226400 para amplificar el Gm12; F-Gly.17G190800 y R-Gly.17G190800 para amplificar el Gm17. Como gen normalizador se utilizó el factor de elongación 1B utilizando los siguientes cebadores F-Gly.02G276600 y R-Gly.02G276600. **A.** Expresión en condiciones control. **B.** Expresión en condiciones de déficit hídrico. **C.** Expresión en estrés vs control. Consciente del valor de $2^{-\Delta CT}$ en estrés sobre $2^{-\Delta CT}$en control (fold change) para cada genotipo y cada gen.

3. Prediccion de elementos en *cis* en los promotores

Con el fin de evaluar si las diferencias de expresión de los genes de soja observadas en el ensayo anterior podrían estar dadas por diferencias en las estructuras de los promotores de los genes, utilizamos la herramienta PlanPan 4.0 (Punto 3.4). Para ello seleccionamos las 1000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de los genes Glyma.06G082700, Glyma.12G226400 y Glyma.17G190800 y realizamos una predicción de los elementos en *cis* presentes en los mismos. Cada elemento está identificado en base a los motivos de unión al ADN de los factores de transcripción que reconocen cada elemento en *cis*. Los resultados pueden observarse en las Fig. 10 y 11.

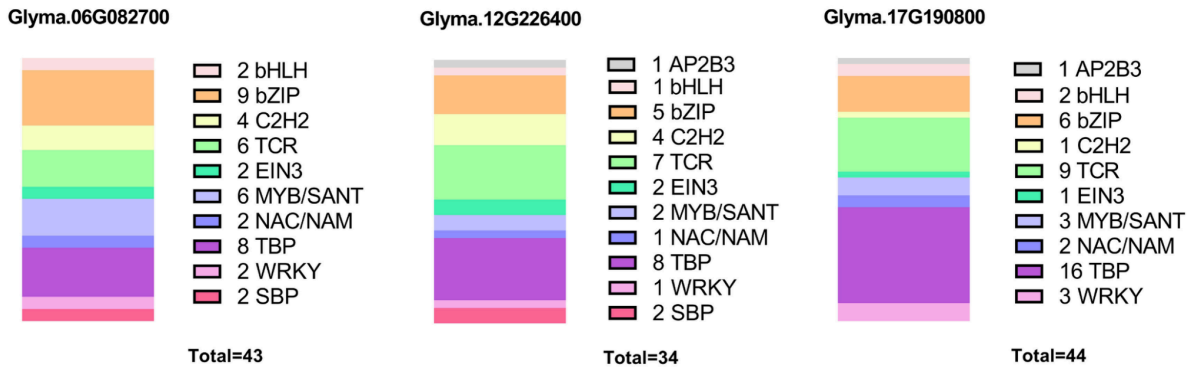


Figura 10. Elementos en *cis* predichos para los promotores de los genes de alta homología a *OsDIAT* en soja. Elementos en *cis* predichos con la herramienta online PlantPan 4.0, graficados en función de los dominios protéicos de unión al ADN que los reconocen. Se tomaron 1000 pb upstream del sitio de inicio de la traducción. A grandes rasgos AP2B3 y WRKY están asociados a la respuesta al etileno; TBP está asociado a la respuesta a auxinas y a la reparación del ADN; los motivos bZip, MYB y NAC están asociados a la respuesta a ABA. Los demás motivos están asociados al estrés por déficit hídrico y a otros tipos de estrés abiótico.

Se han descrito diversos factores de transcripción de respuesta al estrés por sequía en plantas. Algunos de los motivos de reconocimiento de elementos en *cis* presentes en estos factores de transcripción son: WRKY, AP2, bZip, MYB, y NAC. Los últimos tres son regulados por la respuesta a ABA, hormona vegetal involucrada en las respuestas de las plantas frente al estrés abiótico incluido el déficit hídrico. Ninguno de estos motivos se encuentra sobre-representado en el promotor del gen Glyma.12G226400 respecto a los otros dos genes candidatos (Fig 10 y 11). A su vez, al observar el contenido total de secuencias de reconocimiento para estos motivos podemos observar que la cantidad de elementos es bastante menor en el promotor del gen Glyma.12G226400 respecto a los otros genes candidatos (34 elementos para el Glyma.12G226400 respecto a 43 y 44 elementos para los genes Glyma.06G082700 y Glyma.17G190800).

El análisis realizado nos permitió observar que los genes Glyma.06G082700 y Glyma.17G190800 presentan más elementos en *cis* que el promotor del gen Glyma.12G226400, siendo la distribución de los elementos característico de cada uno de los promotores (Fig. 11). Estos resultados en conjunto sugieren que las diferencias en los niveles de inducción por sequía que exhiben estos 3 genes no se explican por diferencias en el número de elementos en cis de respuesta a factores de transcripción de la familia bZip, MYB, y NAC.

Por otro lado, para evaluar si las diferencias de expresión del gen *GmDIAT* observadas entre los genotipos de soja PI 416537 y Génesis 5601 están determinadas por diferencias en la secuencia del promotor, se amplificó una secuencia de 2400 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción del promotor a partir de extracciones de ADN genómico de ambos genotipos. Los amplicones fueron clonados en el vector pJET dando lugar a los vectores pJET-promDIAT(PI) y pJET-promDIAT(Gen) y secuenciados.

No se encontraron diferencias en la secuencia de 2400 pb upstream del sitio de inicio de la traducción del promotor de *GmDIAT* entre los genotipos PI 416537, Génesis 5601 y del genotipo de referencia Williams 82. Se puede inferir que las diferencias de expresion del gen *GmDIAT* observadas entre los genotipos PI 416537 y Génesis 5601, no parecerían estar dados por la presencia de distintos elementos en *cis*.

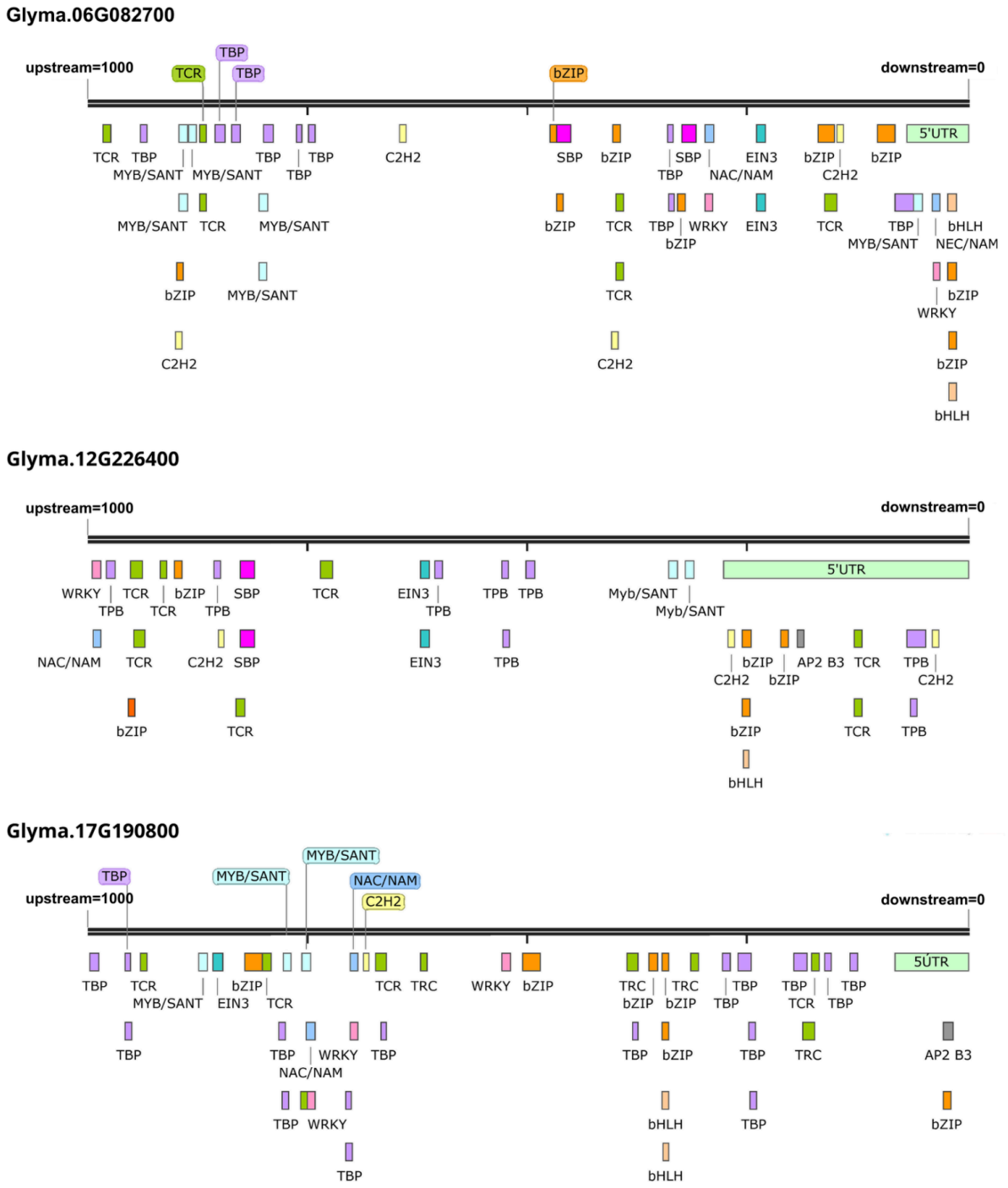


Figura 11. Disposición de elementos en *cis* predichos para los promotores de los genes de alta homología a *OsDIAT* en soja. Disposición de elementos en *cis* predichos con la herramienta online PlantPan 4.0, graficados en función de los dominios protéicos de unión al ADN que los reconocen.

downstream=0 es la posición anterior al sitio de inicio de la traducción y upstream=1000 es la posición -1000 respecto al sitio de inicio de la traducción. En verde agua se representa el 5'UTR de cada gen.

Dado que el gen Glyma.12G226400 es aquel de mayor homología de secuencia con el gen *OsDIAT,* da lugar a una proteína de localización citosólica (tal como lo hace la proteína OsDIAT), y es el único que se sobre-expresa en condiciones de déficit hídrico y salino, decidimos elegirlo para estudiarlo en mayor profundidad para evaluar si podía cumplir las mismas funciones que el gen *OsDIAT* de arroz, en plantas de soja. En la Tabla 2 puede observarse un resumen de las características predichas del gen Glyma.12G226400, desde ahora llamado *GmDIAT.*

Tabla 2. Comparación de características de *OsDIAT* y *GmDIAT*. Se puede observar la homología de secuencia, el peso molecular y la localización subcelular predicha para las proteínas, los niveles de expresión reportados en las plantas durante el desarrollo y al ser expuestas a condiciones de déficit hídrico.

Gen	Homología de secuencia con *OsDIAT* (%)	Peso molecular de la proteína (KDa)	Localización subcelular predicha	Expresión en el desarrollo	Expresión en déficit hídrico (Fold change)
OsDIAT	100	36,3	Citoplasma	Toda la planta	45537
GmDIAT	59-76	37,6	Citoplasma	Raíces	45384

Generación de plantas de *Arabidopsis* transgénicas sobre-expresantes del gen *GmDIAT*

Para caracterizar funcionalmente el gen *GmDIAT* y su relación con la síntesis de BCAAs y la tolerancia al estrés abiótico, se utilizó *Arabidopsis thaliana* como modelo de expresión heteróloga. Se generaron plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobre-expresan el gen *GmDIAT* en su forma natural, así como fusionada a GFP. Para ello, se construyeron dos vectores binarios conteniendo el gen de interés: pUB-DEST-GmDIAT y pK7FWG2,0-GmDIAT (Punto 5). Para ello, se extrajo el ARN total de plantas de soja crecidas en condiciones de déficit hídrico y se sintetizó el ADNc mediante transcripción reversa. A partir del mismo se amplificó el ADNc correspondiente al gen *GmDIAT* mediante PCR utilizando cebadores específicos. El producto de amplificación fue clonado en el vector pENTR2B utilizando enzimas de restricción, para recombinarlo posteriormente con los vectores de destino pUB-DEST y pK7FWG2,0 mediante el método GATEWAY. El vector pUB-DEST permite la expresión del gen *GmDIAT* en forma fuerte y constitutiva, ya que contiene el promotor del gen de ubiquitina 10 de *Arabidopsis.* El vector pK7FWG2,0 también presenta expresión fuerte y constitutiva ya que tiene un promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV), y contiene además un gen reportero GFP, que queda en fase con el gen de interés. En la Fig. 12 puede observarse un esquema de los dos vectores generados.

Las construcciones pUB-DEST-GmDIAT y pK7FWG2,0-GmDIAT fueron introducidas en *Arabidopsis* mediante el método de agroinfiltración de flores, y las semillas resistentes a la selección fueron utilizadas para producir las generaciones T1, T2 y T3 de las distintas líneas

de plantas transgénicas. Se seleccionaron 3 líneas sobre-expresantes (OE: *Over expressing*) de *Arabidopsis* transformadas con el vector pK7FWG2,0-GmDIAT (OE1, OE6 y OE7) y 6 líneas con la construcción pUB-DEST-GmDIAT (OE1, OE2, OE3, OE4, OE5 y OE8). Las plantas transgénicas fueron crecidas en selección y se chequeó la presencia del transgén mediante PCR (Punto 6.2). El genotipado de la generación T2 de plantas de *Arabidopsis* transgénicas puede observarse en la Fig. 13.

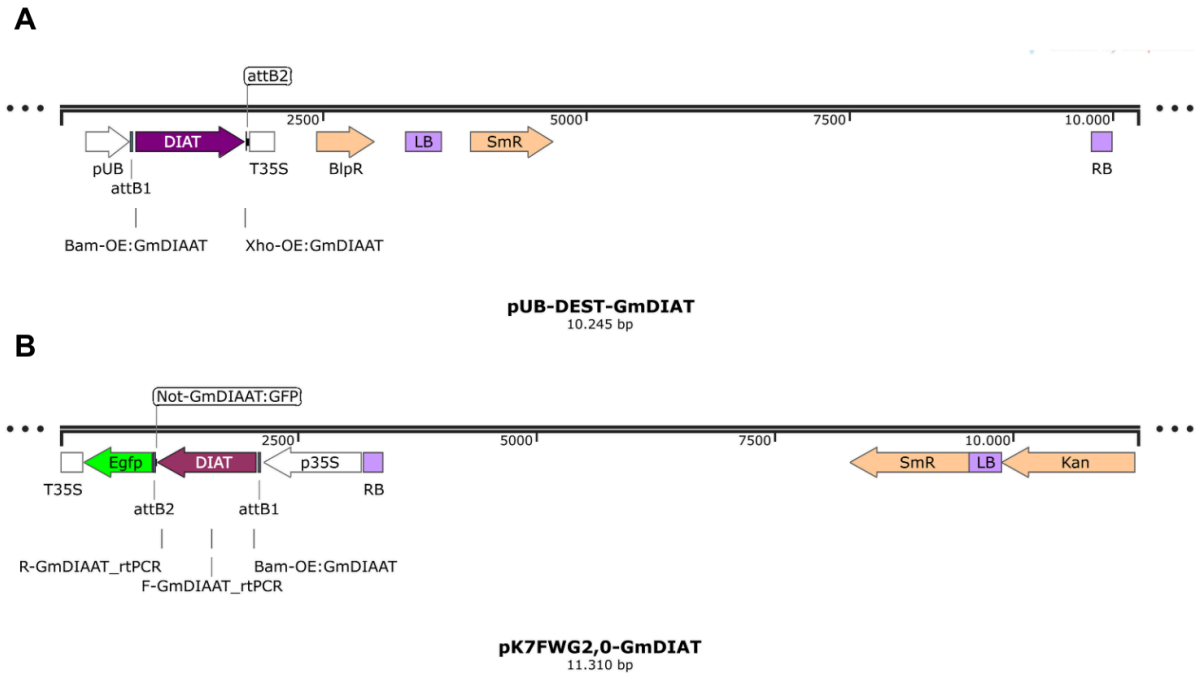


Figura 12. Vectores de expresión conteniendo el gen *GmDIAT*. A. Vector pUB-DEST-GmDIAT **B.** Vector pK7FWG2,0--GmDIAT. pUB: promotor de ubiquitina de *Arabidopsis*; p35S: promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV); T35S: terminador de CaMV; BlpR: resistencia al herbicida BASTA; SmR: gen de resistencia al herbicida estreptomicina/ espectinomicina; kan: gen de resistencia a kanamicina; LB: borde izquierdo; RB: borde derecho; attB1 y attB2: sitios de recombinación del sistema Gateway; Egfp: gen que codifica a GFP:GUS; DIAT: región codificante de *GmDIAT*. Los cebadores utilizados para el clonado de *GmDIAT* y para la determinación de los niveles de expresión por RT-qPCR se encuentran señalados.

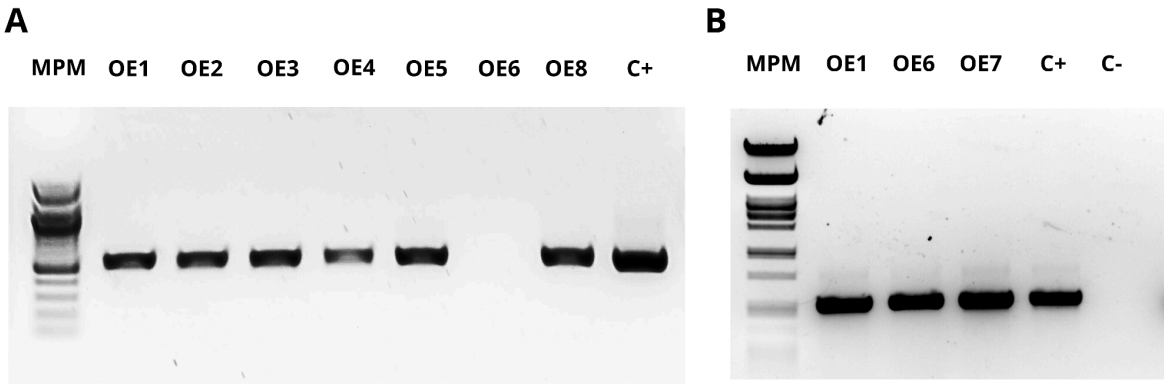


Figura 13. Caracterización molecular de líneas transgénicas de *Arabidopsis* (Generación T2). Para la detección del transgén en las líneas sobre-expresantes se extrajo ADN genómico y se amplificó el gen *GmDIAT*. **A.** Genotipado de líneas transformadas con pUB-DEST-GmDIAT **B.**

Genotipado de líneas transformadas con pK7FWG2,0-GmDIAT. Para las líneas pK7FWG2,0-GmDIAT se utilizaron los cebadores F-GmDIAT_rtpcr y R-GmDIAT_rtpcr (536 pb); para las líneas pUB-DEST-GmDIAT se usaron los cebadores F-GmDIAT_BamHI y R-GmDIAT_XhoI (1052pb). MPM: fago λ digerido con PstI. El control negativo (C-) corresponde a una PCR con plantas WT. Como control positivo (C+) se utilizó el vector utilizado para la transformación de las plantas transgénicas.

Los niveles de expresión de *GmDIAT* en las plantas conteniendo la construcción pUB-DEST-GmDIAT, fueron evaluados mediante qPCR. La secuencia de los cebadores utilizados pueden encontrarse en la Tabla 4 (Anexo) y los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 14.

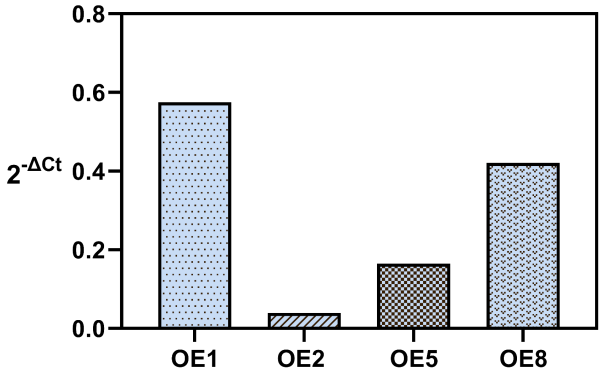


Figura 14. Expresión del gen *GmDIAT* en líneas de *Arabidopsis* transformadas con el vector pUB-DEST-GmDIAT. Evaluación de la expresión del transgén *GmDIAT* mediante qPCR de las líneas sobre-expresantes OE1, OE2, OE5 y OE8. Se reporta el $2^{-\Delta CT}$ para cada línea sobre-expresante, donde $\Delta CT = CT_{GmDIAT} - CT_{Actina}$. Cebadores utilizados para *GmDIAT*: F-GmDIAT_qPCRy R-GmDIAT_qPCR. Cebadores utilizados para la actina: F-AtAct2_qPCR y R-AtAct2_qPCR.

De las 4 líneas analizadas, tres de ellas (OE1, OE5 y OE8) mostraron relativamente alta expresión del transgén, siendo OE1 la línea de mayor expresión.

Localización subcelular de GmDIAT

Se ha reportado que la localización subcelular de las BCATs está relacionada con su actividad enzimática, siendo las BCATs cloroplasticas enzimas participantes en la síntesis de BCAAs, las BCATs mitocondriales enzimas de degradación de los mismos y las BCATs citoplasmáticas y vacuolares, enzimas que pueden participar en una u otra dirección.

Para determinar experimentalmente la localización intracelular de GmDIAT, se utilizaron plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT:GFP,* generadas con el vector pK7FWG2,0-GmDIAT. Se visualizó la proteína quimérica GmDIAT:GFP por microscopía confocal de fluorescencia a partir de hojas transgénicas, así como de protoplastos generados a partir de las mismas (Punto 9). Las imágenes obtenidas pueden visualizarse en la Fig. 15.

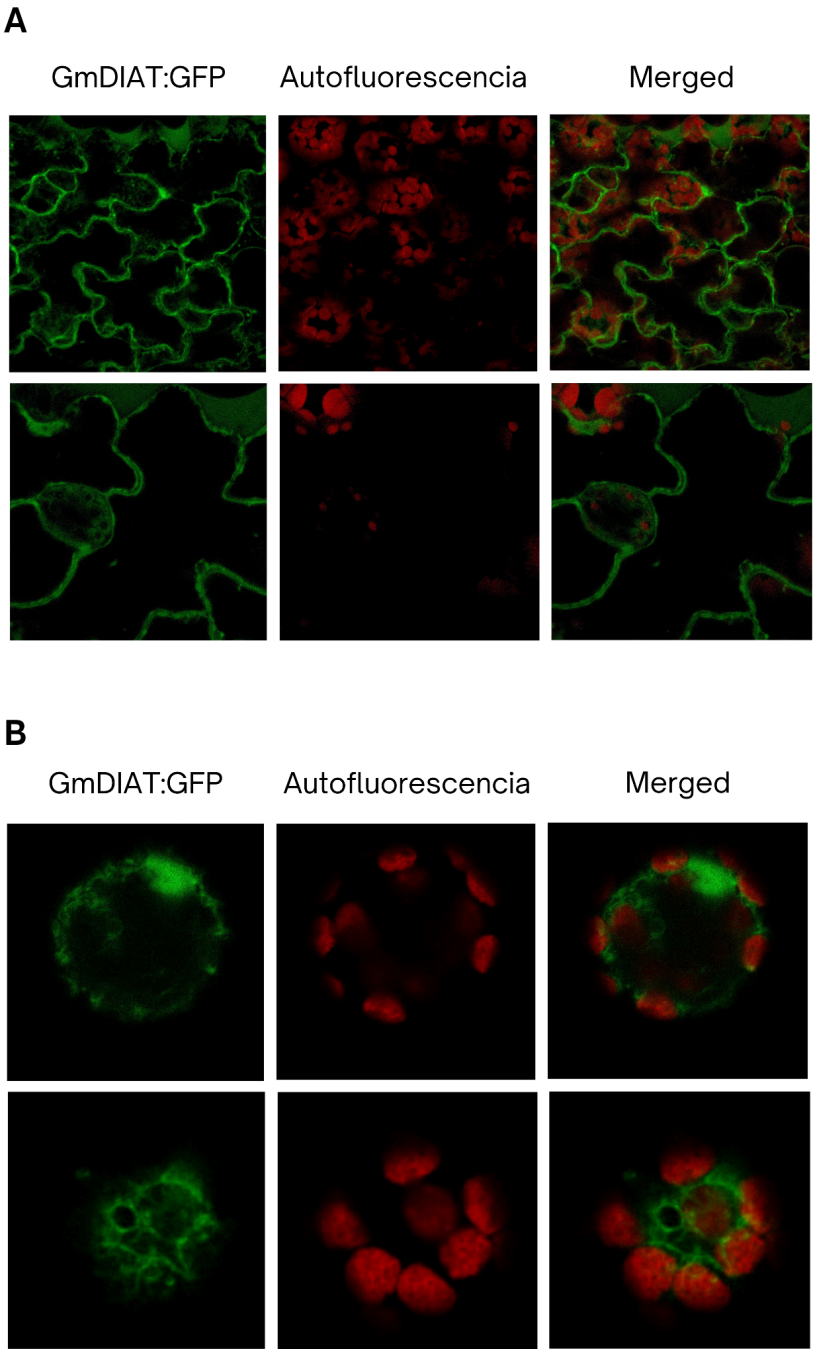


Figura 15. Localización subcelular de GmDIAT:GFP *Arabidopsis* pK7FWG2,0-GmDIAT. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal de hojas (**A**) y protoplastos de hojas (**B**) de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT:GFP* en forma estable. En rojo se ve la autofluorescencia de los cloroplastos y el verde la fluorescencia de la proteína quimérica GmDIAT:GFP.

A partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal, representadas en las Fig. 15, proponemos que la proteína quimérica tiene una localización citosólica. Esto concuerda con las predicciones de localización obtenidas mediante programas bioinformáticos, así como con los resultados esperados, dada la alta similitud de secuencia entre el gen *GmDIAT* y el *OsDIAT* cuya proteína codificante es de localización citosólica. Dado que la función de las BCATs está vinculada a la localización subcelular de las mismas, resulta alentador que la localización de GmDIAT sea la misma que la de OsDIAT, apoyando la idea de que estas

proteínas puedan presentar homología funcional en las respectivas especies de las que provienen.

Cuantificación de BCAAs en plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT*

Con el fin de esclarecer el posible rol del gen *GmDIAT* en el metabolismo de BCAAs, se determinó el contenido de BCAAs en 4 líneas de *Arabidopsis* transgénicas con sobre-expresión de *GmDIAT*.

Muestras de hojas de las líneas OE1, OE2, OE5 y OE8 de *Arabidopsis* generadas con el vector pUB-DEST-GmDIAT, junto con hojas del genotipo WT de plantas cultivadas en condiciones control, fueron utilizadas para cuantificar el contenido de BCAAs mediante HPLC-FLD después del etiquetado con o-ftalaldehído (OPA), tal como se describe en el Punto 8. Los resultados de dicho análisis pueden observarse en la Fig. 16.

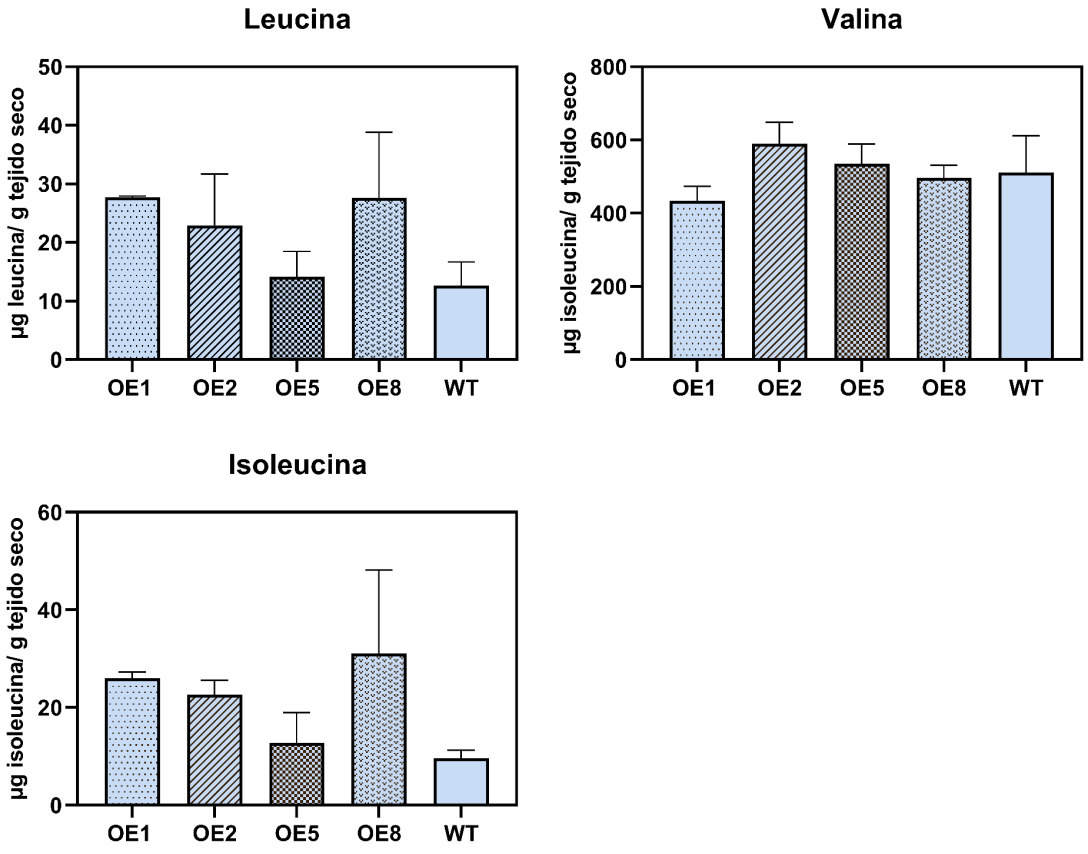


Figura 16. Niveles de BCAAs en líneas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* y de plantas WT. Se analizó el contenido de Valina, Leucina e Isoleucina en hojas de las líneas de *Arabidopsis* OE1, OE2, OE5, OE8 generadas con el vector pUB-DEST-GmDIAT y de plantas de WT (Col-0). No se encontraron diferencias significativas con p valor <0.05.

En la Fig.16 puede observarse que el contenido de isoleucina y leucina podría ser mayor en plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* que en las plantas WT, aunque

se observó una gran variación entre muestras. Con respecto a la Valina, no parece haber diferencias significativas entre todos los genotipos analizados.

Fenotipado de plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen GmDIAT en condiciones de estrés

Para evaluar el rol del gen *GmDIAT* en la tolerancia al estrés abiótico se utilizaron las líneas OE1 y OE5 generadas con el vector pUB-DEST-GmDIAT. Se realizaron ensayos de germinación y de crecimiento *in vitro* en condiciones de estrés por NaCl y manitol, así como ensayos de déficit hídrico en turba.

1. Ensayos de germinación *in vitro*

Para los ensayos de germinación se utilizaron semillas de las líneas OE1 y OE5 de *Arabidopsis* pUB-DEST-GmDIAT, así como semillas de *Arabidopsis* WT. Se sembraron 58 semillas de cada línea en placas de Petri conteniendo MS ½ pH 5,7 0,85% agar, y en placas adicionadas con 100 mM de NaCl, o 250 mM de Manitol. Se utilizaron tres placas por condición y se realizó el ensayo por triplicado. Se dejaron las placas 4 días a 24 °C y se contaron las plantas germinadas de cada genotipo (Punto 10.1). Los resultados pueden observarse en la Figura 17.

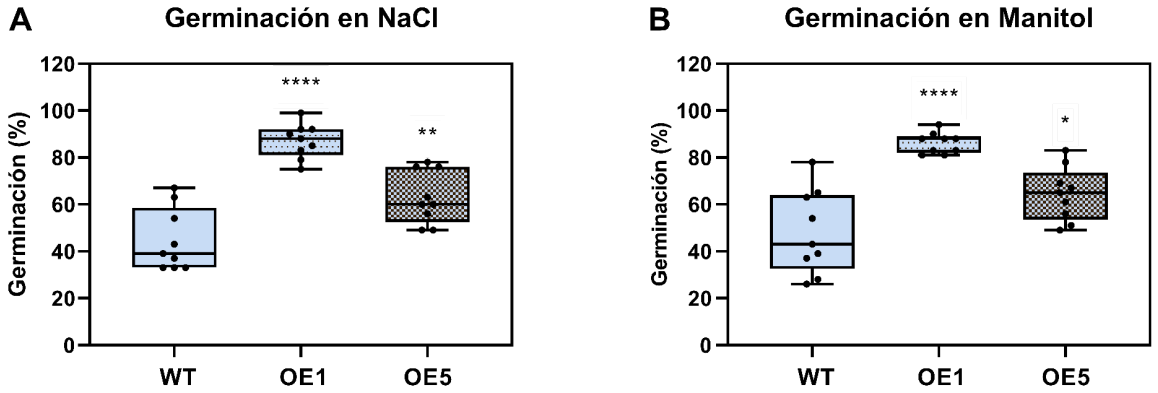


Figura 17. Germinación de plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* y de plantas WT en condiciones de estrés y condiciones control de crecimiento. Porcentaje de germinación de las líneas OE1, OE5 y plantas WT crecidas en condiciones de NaCl 100 mM **(A)** y Manitol 250 mM **(B)** en relación a su germinación en condición control (MS ½). Diferentes asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas entre la líneas OE y las plantas WT: * p valor < 0,05 , ** p valor < 0.0045, *** p valor < 0,0003, p valor < ****<0.0001.

Como se observa en la Fig. 17 ambas líneas OE presentan un mayor porcentaje de germinación en condiciones de estrés por NaCl 100 mM y manitol 250 mM respecto a las plantas WT. Comparando las medianas, las líneas OE1 y OE5 presentaron una germinación del 85% y 60% respectivamente, en condiciones de NaCl y manitol respecto a la condición control (MS ½); mientras que las plantas WT presentaron una germinación del 40% en ambas condiciones de crecimiento. Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de *GmDIAT* en *Arabidopsis* podría promover la germinación de las plantas en condiciones de

estrés osmótico y salino. Estos resultados además son coherentes con las diferencias de los niveles de expresión del transgén entre ambas líneas, siendo que la línea con mayor expresión de *GmDIAT* y mayor acumulación de BCAAs (OE1), mostró un mayor porcentaje de germinación en condiciones de estrés que las la línea OE5 y más aún que las plantas WT.

2. Ensayos de crecimiento *in vitro*

Para evaluar el crecimiento de las líneas transgénicas de *Arabidopsis* en condiciones de estrés se utilizaron las líneas OE1 y OE5 de *Arabidopsis* pUB-DEST-GmDIAT, así como semillas de *Arabidopsis* WT. Para ello, plantas de 6 días de crecimiento se pasaron a placas con MS o con MS y NaCl 100 mM o Manitol 250 mM. Las plántulas se colocaron de manera vertical, recostadas sobre el medio de cultivo. En cada placa se colocaron 10 plantas de una línea OE (OE1 o OE5) y 10 plantas WT. Se utilizaron 2 placas de cada línea por condición de crecimiento. Se midió el crecimiento de la raíz al día 5 posterior al pasaje de las plántulas. Además, se evaluó el contenido de agua y peso seco de las plantas expuestas a condiciones de NaCl 100 mM. El ensayo se describe en el Punto 10.2. Los resultados pueden observarse en las Fig.18 y 19.

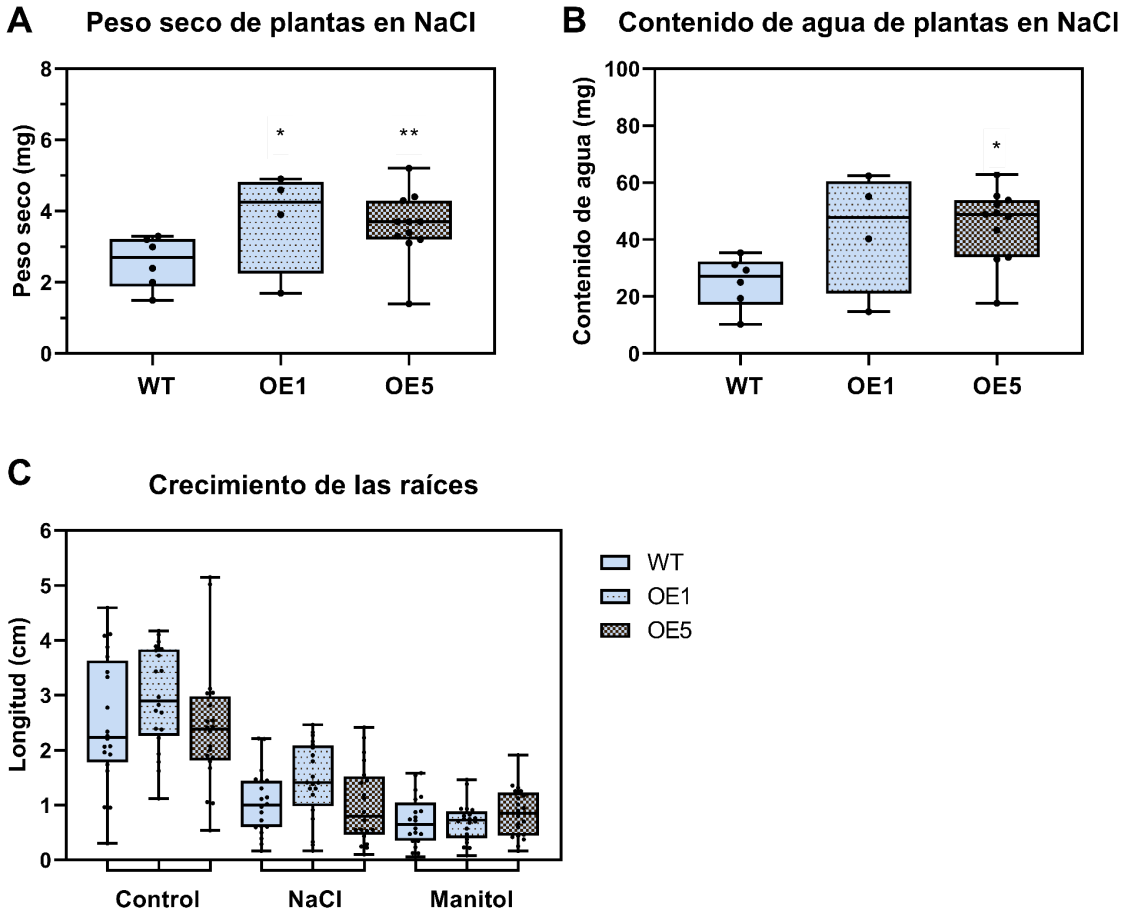


Figura 18. Crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* y de plantas WT en condiciones de estrés y condiciones control de crecimiento. A. Peso seco (mg) de las plantas OE1, OE5 y WT crecidas en 100 mM NaCl al día 11. **B.** Contenido de agua (mg) de las plantas OE1, OE5 y WT crecidas en 100 mM NaCl al día 11. **C**. Crecimiento de las raíces de

plantas OE1, OE5 y WT crecidas en condiciones control (MS ½) y condiciones de estrés (NaCl 100 mM y manitol 250 mM) al día 5 de pasaje. Diferentes asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas entre la líneas OE y las plantas WT en las mismas condiciones de crecimiento: * p valor < 0,05 , ** p valor < 0.0045.

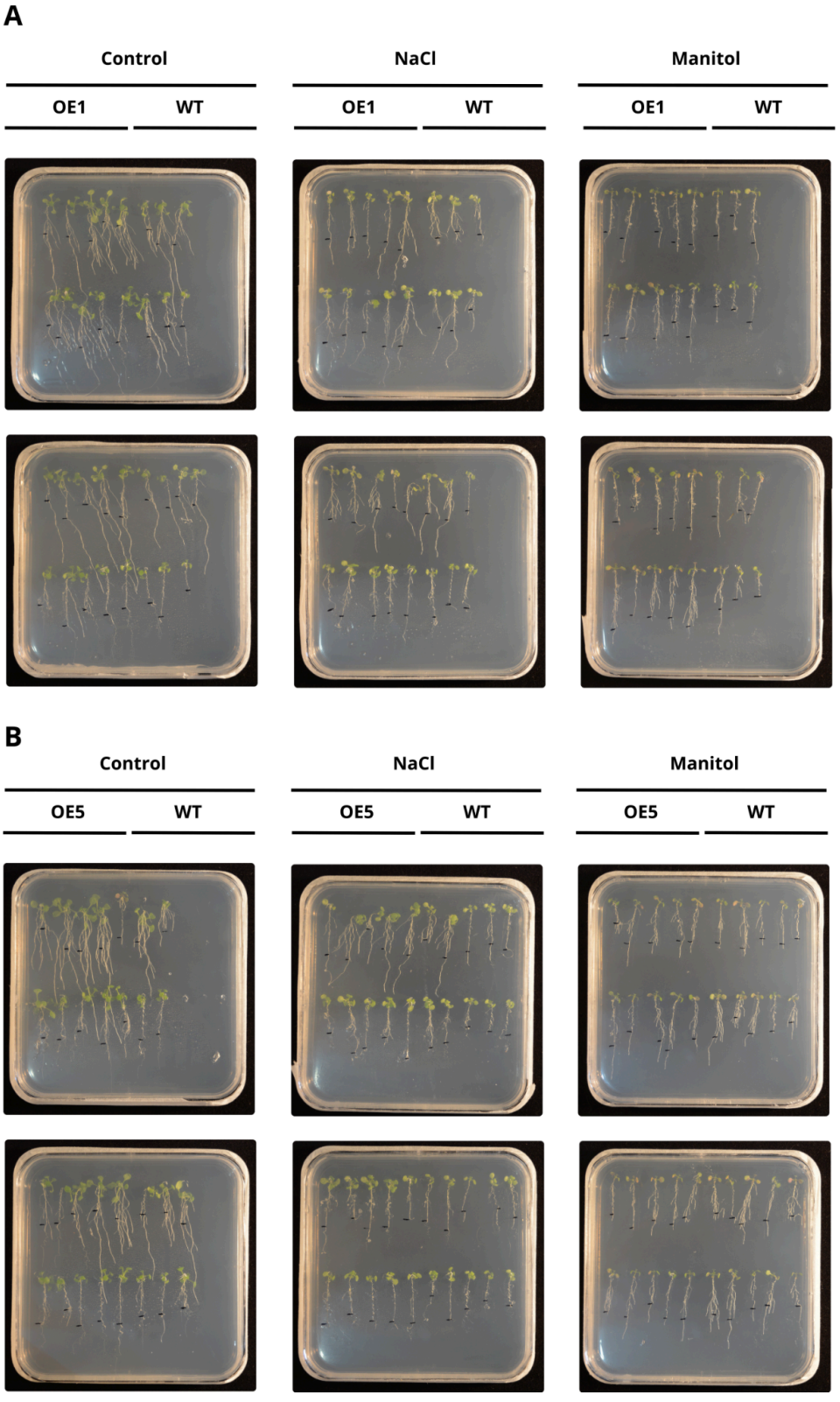


Figura 19. Crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* y de plantas WT en condiciones de estrés y condiciones control de crecimiento. Crecimiento de plantas OE1 **(A)** y OE5 **(B)** crecidas en condiciones control (MS ½) y condiciones de estrés (NaCl 100 mM o manitol 250 mM) junto con sus respectivos controles WT, al día 5 de pasaje.

Los resultados mostraron que, si bien las diferencias de crecimiento de la raíz entre los genotipos no son estadísticamente significativas, comparando las medianas, la línea OE1 presenta raíces más largas que las plantas WT en condiciones de NaCl a 100 mM (Fig 18 C y 19). En la Fig. 18 A puede observarse que ambas líneas transgénicas presentan un peso seco mayor que las plantas WT en condiciones de 100 mM de NaCl, y parecen tener una tendencia a acumular mayores contenidos de agua en estas condiciones de crecimiento respecto a las plantas WT (Fig. 18 B). Las plantas transgénicas acumularon una mayor biomasa total respecto a las plantas WT, lo cual podría estar relacionado a una mejor performance de las plantas frente a condiciones de estrés salino.

3. Ensayos de déficit hídrico en tierra

Para evaluar la tolerancia de las plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* frente a condiciones de déficit hídrico se realizaron ensayos en turba como sustrato. Se hicieron tres ensayos preliminares para poner a punto las condiciones del ensayo. En ellos se evaluó la dinámica de déficit hídrico de las plantas a través de medidas del contenido de agua del sustrato (WC: *water content*), y se midió el parámetro fotosintético Fv/Fm, el cual nos permitió inferir el estado fotosintético de las plantas durante el ensayo. Posteriormente se realizó un ensayo con un mayor número de plantas, con el fin de evaluar la sobrevida y el rendimiento en función del peso de las semillas de las distintas líneas OE y plantas WT. En este caso, se determinaron también algunos parámetros como la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el contenido de clorofila de las plantas crecidas en déficit hídrico y condiciones control. En la Tabla 3 se muestran las condiciones y medidas realizadas en los ensayos de déficit hídrico en tierra.

En los primeros 3 ensayos se sembraron semillas de las líneas OE1, OE5 y WT en macetas con turba y se dejaron crecer en condiciones óptimas (control) durante 3 semanas, momento en el cual se interrumpió el riego. Se utilizaron entre 8 y 10 plantas de cada genotipo por cada condición (déficit hídrico y control). Las macetas fueron colocadas en gradillas de forma randomizada. Las plantas se dejaron deshidratar hasta que el sustrato alcanzó un 4-13% de su capacidad de retención de agua. Posteriormente, se retomó el riego (rehidratación) y se evaluó la sobrevida de las plantas al cabo de 6 días. Se calculó el contenido de agua del sustrato a lo largo del tiempo a través de medidas del peso de las macetas y se utilizó un PAM (*Pulse Amplitude Modulation*) para evaluar el parámetro fotosintético Fv/Fm a lo largo del tiempo. El ensayo se realizó tres veces. Los resultados pueden observarse en la Fig. 20.

Tabla 3. Condiciones y medidas de los ensayos de déficit hídrico en tierra. Se utilizaron las líneas OE1 y OE5 de *Arabidopsis* generadas con el vector pUB-DEST-GmDIAT y plantas WT. Se estudiaron dos condiciones de crecimiento: condiciones control y de déficit hídrico. WC: contenido de agua del sustrato; Fv/Fm: parámetro fotosintético medido con un PAM.

	Ensayos preliminares	Ensayo grande
Condiciones del ensayo	8- 10 plantas/ línea/ condición	48 plantas / línea/ condición
	déficit hídrico hasta 4- 13% WC	déficit hídrico hasta 12% WC
	Rehidratación por 6 días	Rehidratación por 6 días
Medidas	WC a lo largo del tiempo	WC a lo largo del tiempo
	Sobrevida de las plantas	Sobrevida de las plantas
	Fv/Fm a lo largo del tiempo	Rendimiento (mg de semillas)
		Contenido de Clorofila A y B
		Contenido de ROS (H_2O_2, $O_2^{\bullet-}$) y peroxidación lipídica

A partir de los tres ensayos de déficit hídrico en turba, y como puede observarse en la Fig. 20, pudimos ver que la pérdida de agua durante el período de interrupción del riego, fue similar entre las líneas transgénicas y la WT (Fig. 20 A y B) por lo cual la sobre-expresión del gen *GmDIAT* no parecería generar cambios en el consumo de agua y transpiración de las plantas. Los efectos más severos de déficit hídrico fueron observados a partir del día 13, lo cual se corresponde con contenidos de agua del sustrato del 20%. Consideramos estrés severo a partir del día en el cual dejamos de poder tomar medidas con el PAM en las plantas expuestas a déficit hídrico dada la reducción del área foliar. En cuanto a las medidas de Fv/Fm, pudimos observar que dicho parámetro se mantiene bastante estable en el tiempo y cae rápidamente cuando las plantas presentan fenotipos de estrés severo (Fig. 20 D). En la imagen C de dicha figura se puede observar un gráfico de Fv/Fm promedio vs tiempo, para el cual se calculó el promedio de Fv/Fm de todas las plantas de cada línea en cada condición, considerando un Fv/Fm=0, para aquellas plantas cuya reducción foliar impidió realizar las medidas con el PAM. En la imagen D, se puede observar el valor de Fv/Fm vs tiempo de cada planta expuesta a estrés en forma individual. A partir de los datos de Fv/Fm de los ensayos podemos inferir que la línea OE1 podría presentar una mayor tolerancia al déficit hídrico que las plantas WT, ya que dicho parámetro fotosintético se mantiene durante más tiempo en condiciones de déficit hídrico. Al día 15 de déficit hídrico, hay solo una planta WT que tienen un valor de Fv/Fm >0, mientras que para la línea OE1 hay dos plantas con valor de Fv/Fm >0. Dado que este parámetro está relacionado principalmente con el estado del fotosistema II, podríamos inferir que la sobre-expresión de *GmDIAT* en la línea OE1 podría promover el mantenimiento de los procesos fotosintéticos en condiciones de déficit hídrico durante más tiempo.

Luego de 6 días de rehidratación se evaluó la sobrevida de las plantas, resultando en un 38 % para OE1, 25% para OE5, y un 13 % para las plantas WT (Fig. 20 D, E). A partir de estos resultados podemos decir que las líneas OE presentan mejores niveles de recuperación que las plantas WT.

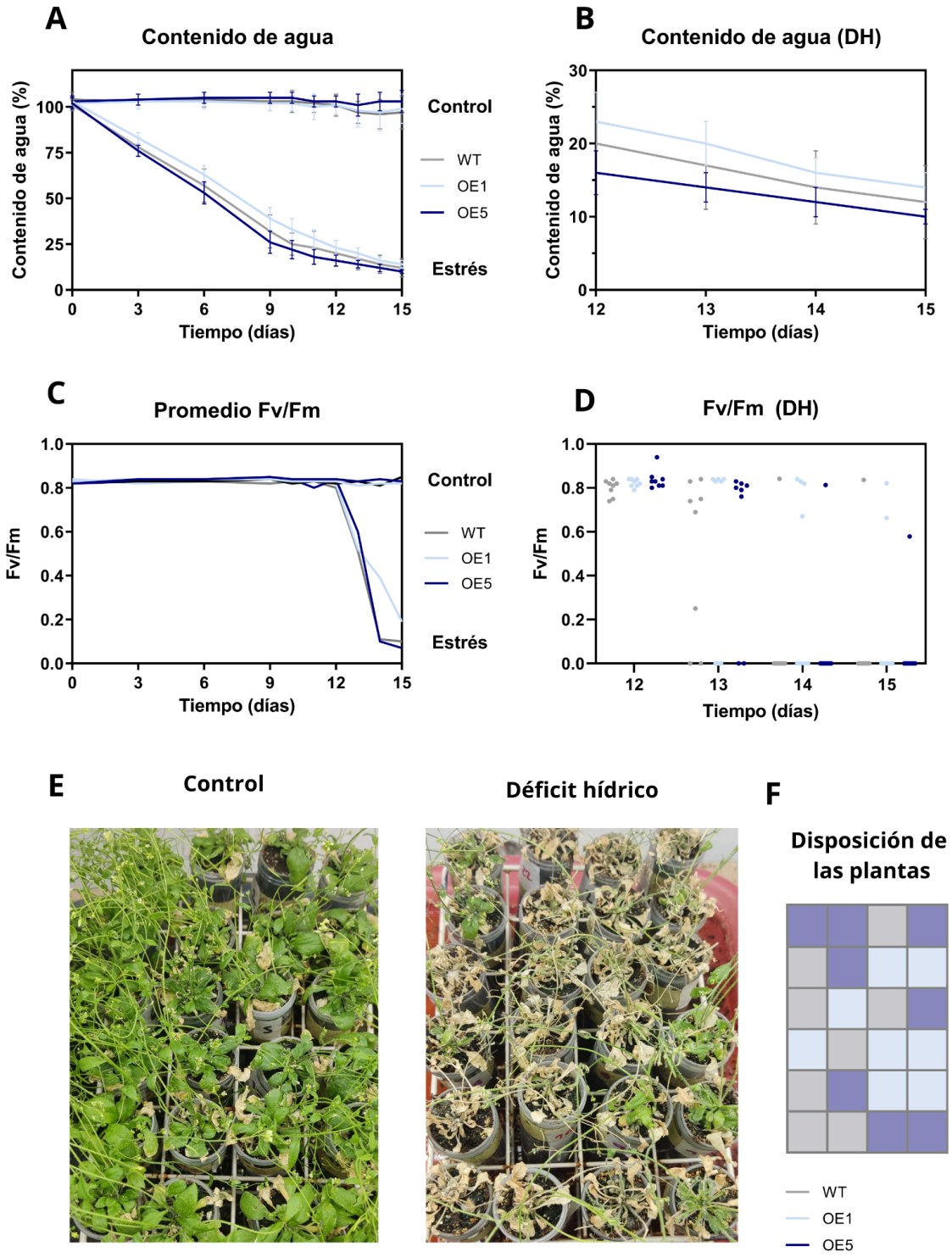


Figura 20. Ensayo de déficit hídrico en turba de las *Arabidopsis* sobre-expresante del gen *GmDIAT*. Crecimiento de plantas OE1, OE5 y WT en condiciones de déficit hídrico (DH) y control. **A.** Contenido de agua del sustrato a lo largo del ensayo. **B.** Contenido de agua del sustrato de plantas en estrés en los días de mayor déficit hídrico. **C.** Promedio de las medidas de Fv/Fm de cada línea en cada condición, tomadas con un PAM a lo largo del ensayo. **D.** Medidas de Fv/Fm de cada planta en los días de mayor déficit hídrico. **E.** Plantas control (izquierda) y plantas en condiciones de déficit hídrico (derecha), al día 6 de recuperación. **F.** Disposición randomizada de las plantas en la gradilla. Pocillos grises: WT; celestes: OE1; azules: OE5.

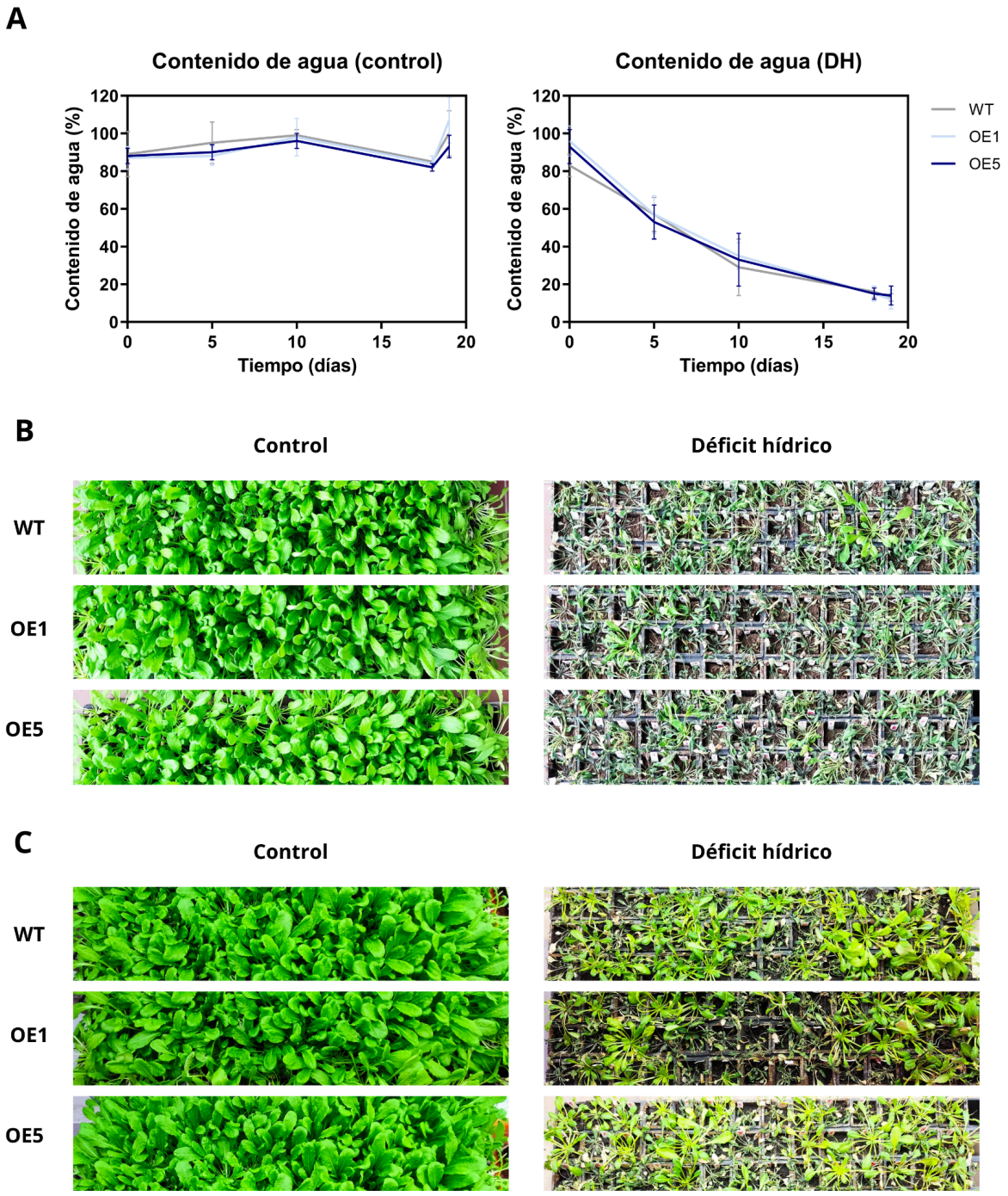


Figura 21. Ensayo de déficit hídrico en turba de las *Arabidopsis* sobre-expresante del gen *GmDIAT* con un mayor número de plantas. Crecimiento de plantas OE1, OE5 y WT en condiciones de déficit hídrico (DH) y control. **A.** Contenido de agua del sustrato (WC) a lo largo del ensayo en plantas control (izquierda) y plantas en déficit hídrico (derecha) **B.** Plantas en condiciones control y condiciones de déficit hídrico al día 20 (12% WC). **C.** Recuperación de las plantas al día 6 de rehidratación.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los primeros ensayos de déficit hídrico, se propuso realizar un ensayo utilizando una mayor cantidad de plantas de cada genotipo para cada condición de crecimiento. Para ello, semillas de las líneas OE1, OE5 y WT fueron germinadas en macetas con turba y raleadas para dejar una única planta por maceta. Para el ensayo se utilizaron 48 plantas de 5 semanas por genotipo por condición, dispuestas en forma randomizada en la gradilla. Se dejaron deshidratar las plantas hasta un 12% de contenido de agua, momento en el cual se comenzaron a rehidratar. Se evaluó el contenido de agua del sustrato a lo largo del tiempo a través de medidas del peso de las macetas. Se tomaron muestras de hojas al día 18 y 19 de déficit hídrico para evaluar el contenido de superóxido, peróxido de hidrógeno, así como el estado de peroxidación lipídica. Para visualizar la acumulación de superóxido se realizaron tinciones con NBT (*Nitroblue Tetrazolium*) con la metodología propuesta por Trujillo *et al.,* 2004; para evaluar la acumulación de peróxido de hidrógeno se realizaron tinciones con Safarina-O de acuerdo al protocolo de Lucena *et al.,* 2003; y para evaluar la peroxidación lipídica se utilizó el reactivo de Schiff de Thermo Scientific. También se evaluó el contenido de clorofila A y B a partir de hojas tomadas al día 19 de déficit hídrico, utilizando la metodología propuesta por Wolken & Schwertz, 1953. Se determinó la sobrevida de las plantas al día 6 de rehidratación. Las plantas sobrevivientes se dejaron semillar para calcular el rendimiento de las plantas a través del peso de las semillas cosechadas. Las condiciones y metodología se encuentran detalladas en el Punto 10.3.

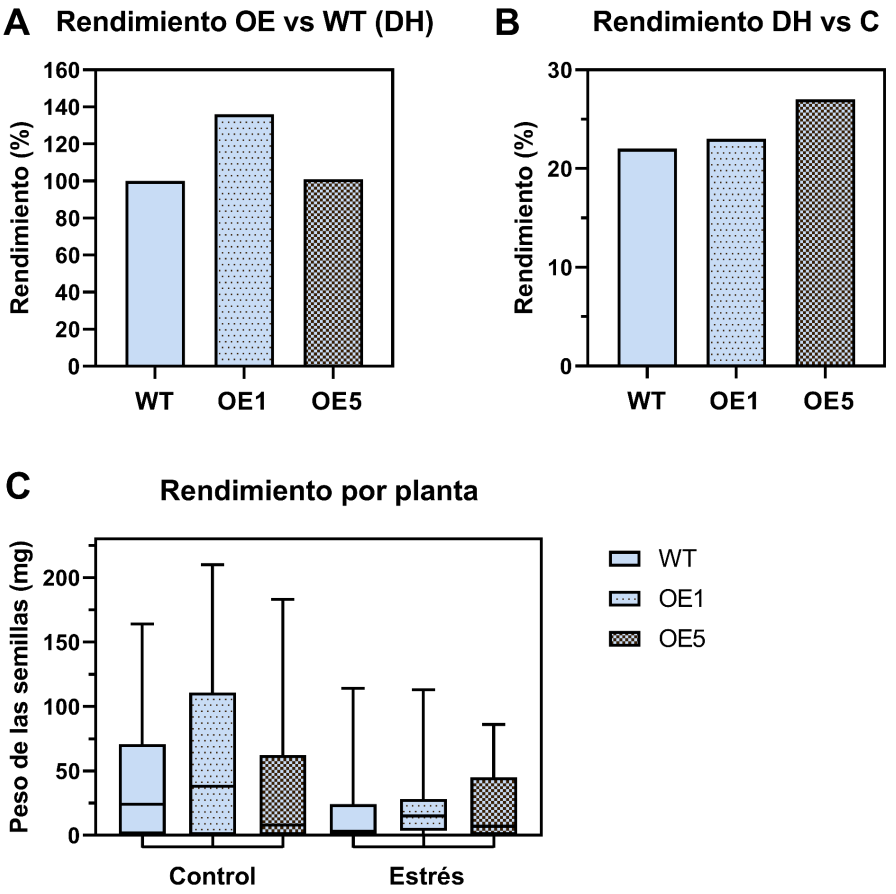


Figura 22. Rendimiento de plantas de las *Arabidopsis* sobre-expresante del gen *GmDIAT* en condiciones de déficit hídrico y control. A. Rendimiento total de las líneas OE1, OE5 y WT en condiciones de déficit hídrico respecto al rendimiento de las plantas WT en las mismas condiciones. **B.** Rendimiento total de las plantas OE1, OE5 y WT en condiciones de déficit hídrico respecto al rendimiento de cada genotipo en condiciones control de crecimiento. **C.** Rendimiento de las líneas

OE1, OE5 y plantas WT en condiciones control y condiciones de déficit hídrico, en base a los mg de semillas colectados de cada planta individual. DH: déficit hídrico; C:condiciones control.

En la Fig. 21 puede observarse el contenido de agua de las macetas a lo largo del ensayo, así como el estado de las plantas al finalizar el ensayo de déficit hídrico y luego de 6 días de rehidratación. En la Fig. 22 se muestran los resultados del rendimiento de las plantas en función del peso de las semillas cosechadas. Los resultados de acumulación de superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica pueden observarse en las Fig. 23, 24 y 25 respectivamente. Los resultados de la cuantificación de clorofila A y B pueden encontrarse en la Fig. 26.

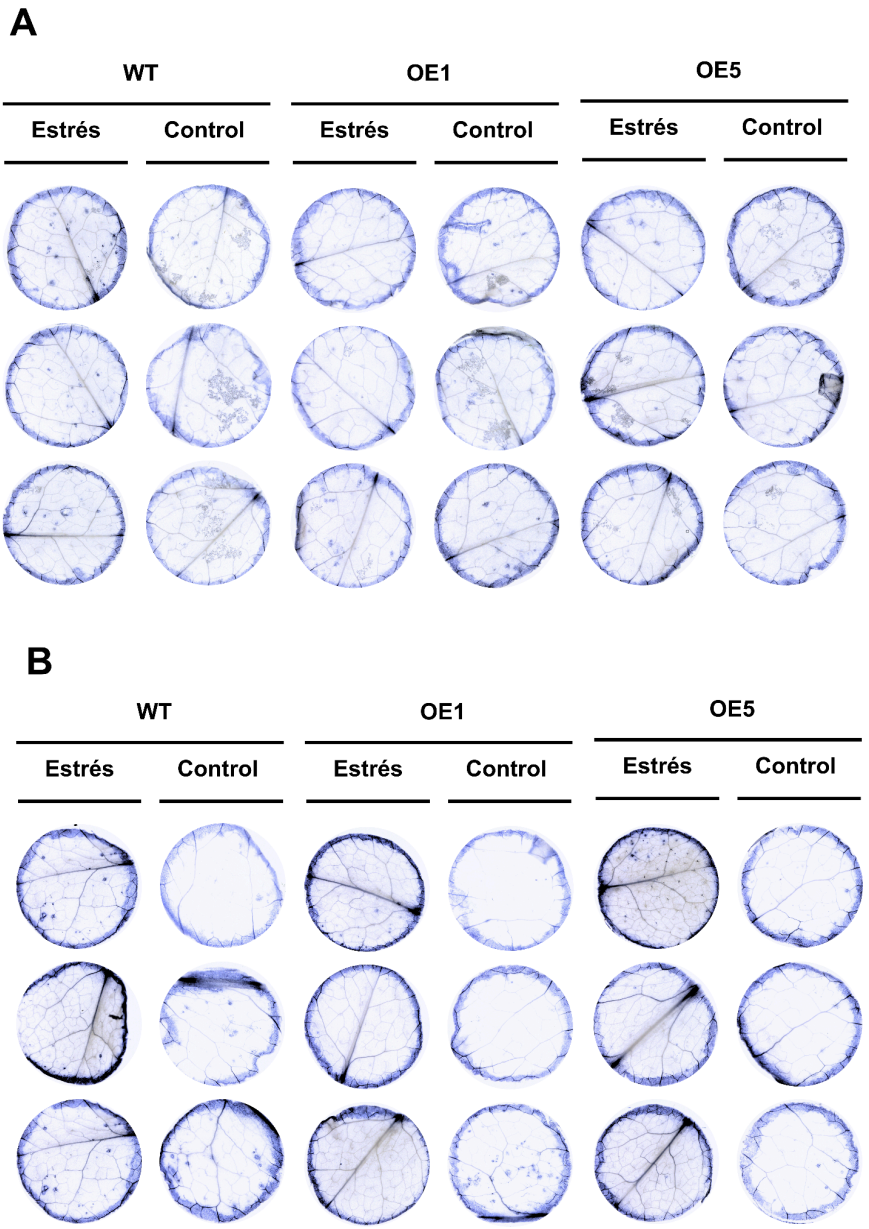


Figura 23. Acumulación de superóxido en plantas OE y WT crecidas en condiciones de estrés y control. Tinción con NBT de hojas de plantas OE1, OE5 y WT crecidas en condiciones control de crecimiento (control) y condiciones de déficit hídrico (estrés), en los días 10 (WC 30%) **(A)** y 18 de déficit hídrico (WC 15%) **(B)**.

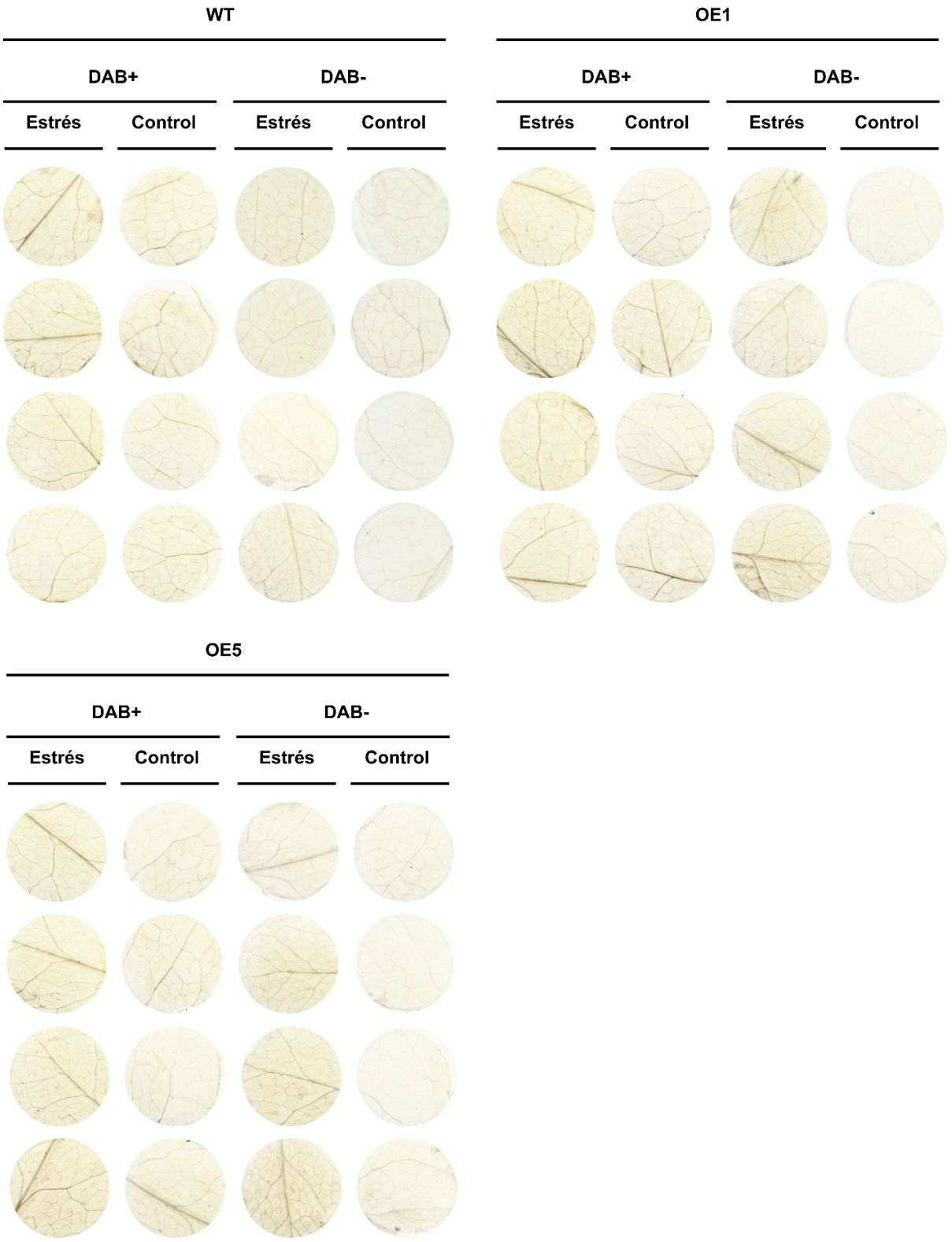


Figura 24. Acumulación de peróxido de hidrógeno en plantas OE y WT crecidas en condiciones de estrés y control. Tinción con DAB de hojas de plantas OE1, OE5 y WT crecidas en condiciones control de crecimiento (control) y condiciones de déficit hídrico (estrés), al día 18 de déficit hídrico (WC 15%). DAB+: incubación de las hojas con DAB; DAB-: incubación de las hojas sin DAB.

En la Fig. 21 A puede observarse que, al igual que en los ensayos anteriores, la cinética de pérdida de contenido de agua del sustrato es similar en los tres genotipos. En cuanto a la sobrevida de las plantas, las WT presentaron un mayor porcentaje de sobrevida respecto a las plantas OE, con un 67% de recuperación respecto a un 57% de la línea OE1 y un 55% de la OE5. Este resultado difiere de lo observado en los primeros ensayos de déficit hídrico, en los cuales se veía una mejor sobrevida de las plantas OE.

En la Fig. 22 puede observarse el rendimiento de las plantas OE y WT en condiciones de déficit hídrico y condición control. Como se ve en la imagen C de dicha figura, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento individual de las plantas OE respecto a las plantas WT en ninguna de las condiciones del ensayo. Sin embargo, comparando las medianas y las dispersiones de los datos, parecería que las líneas OE tienden a presentar un mayor rendimiento de producción de semillas en función del peso de las semillas respecto a las plantas WT en condiciones de déficit hídrico. En cuanto al rendimiento total (peso de las semillas de todas las plantas de la misma líneas y condición), la línea OE1 presenta un 130 % de rendimiento en comparación con las plantas WT, mientras que la línea OE5 presenta el mismo rendimiento que las plantas WT, al ser crecidas en condiciones de déficit hídrico (imagen A). Por otro lado, se puede observar que en condiciones de déficit hídrico el rendimiento de las plantas se ve fuertemente afectado, dando lugar a rendimientos aproximados del 23% para OE1, 27% para OE5 y 22% para las plantas WT, en comparación con la condición control de crecimiento (imagen B). En este sentido, podemos observar que la línea OE5 es la que reduce menos su rendimiento en condiciones de déficit hídrico. En conjunto estos resultados sugieren que la sobre-expresión de *GmDIAT* en plantas de *Arabidopsis* podría mejorar el rendimiento de las plantas al ser sometidas a condiciones de déficit hídrico.

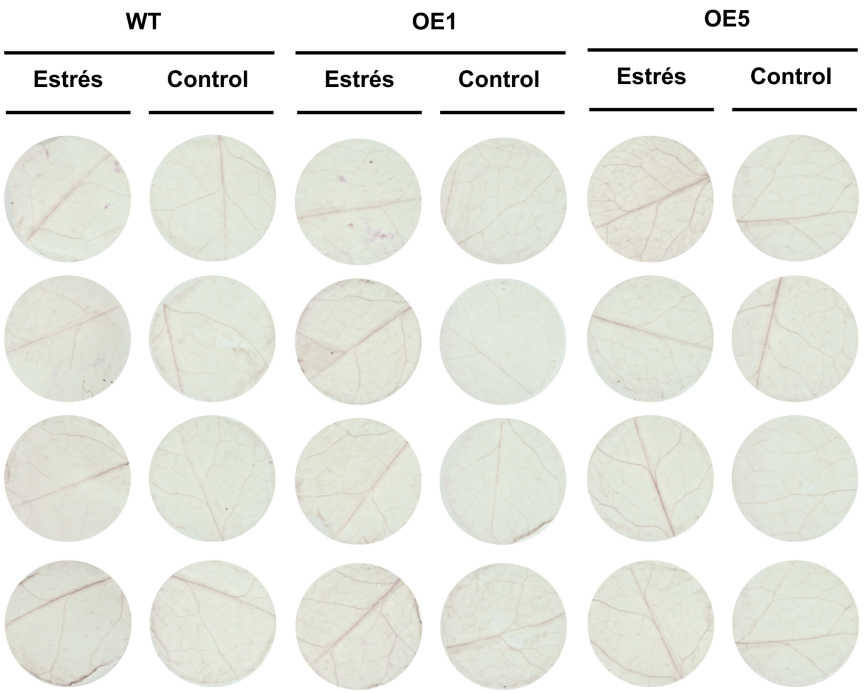


Figura 25. Peroxidación lipídica en plantas OE y WT crecidas en condiciones de estrés y control. Reacción de de Schiff de hojas de plantas OE1, OE5 y WT crecidas en condiciones control de crecimiento (control) y condiciones de déficit hídrico (estrés), al día 19 de déficit hídrico (WC 13%).

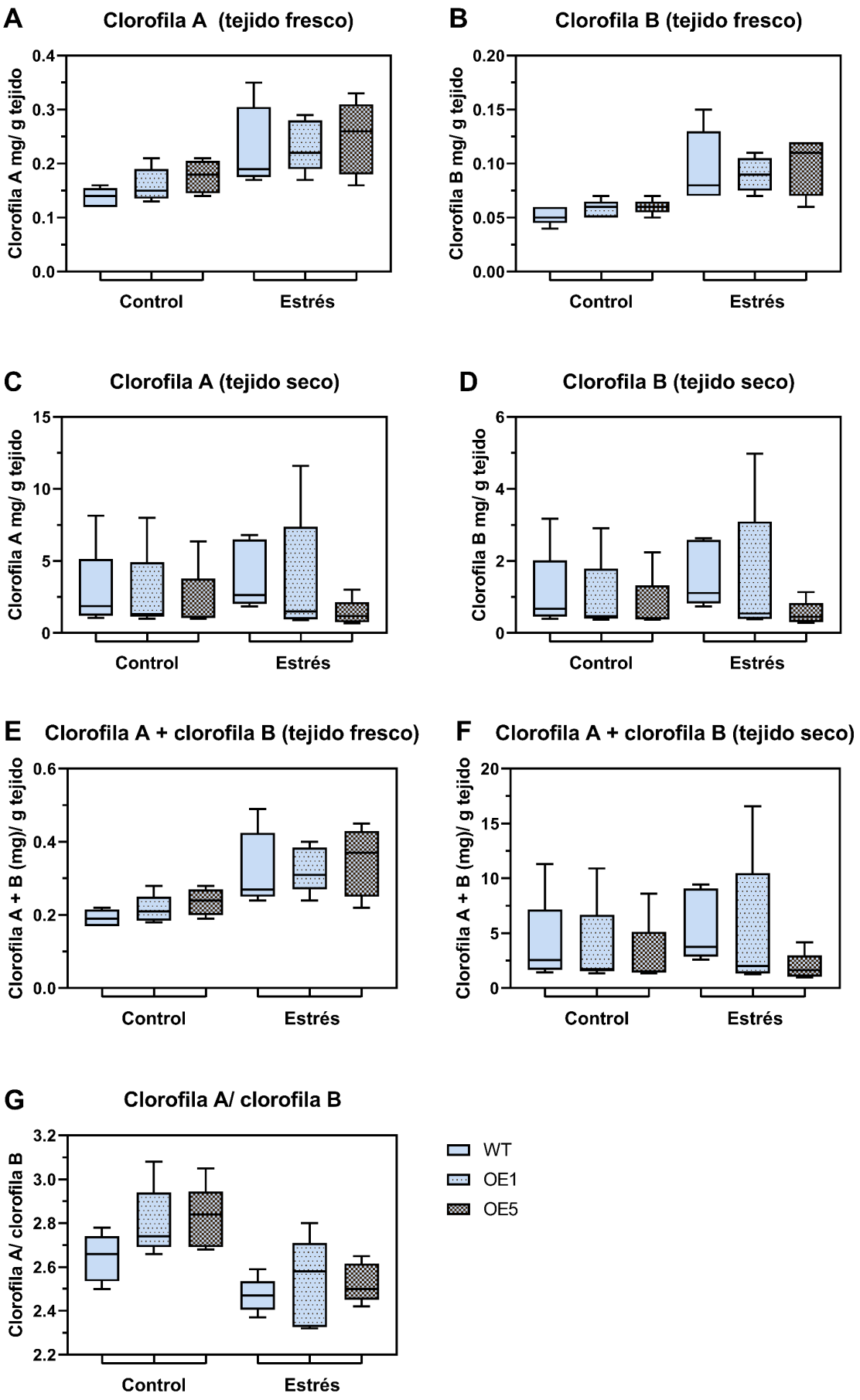

A
Clorofila A (tejido fresco)
Clorofila A mg/ g tejido
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Control
Estrés
B
Clorofila B (tejido fresco)
Clorofila B mg/ g tejido
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Control
Estrés
C
Clorofila A (tejido seco)
Clorofila A mg/ g tejido
15
10
5
0
Control
Estrés
D
Clorofila B (tejido seco)
Clorofila B mg/ g tejido
6
4
2
0
Control
Estrés
E
Clorofila A + clorofila B (tejido fresco)
Clorofila A + B (mg)/ g tejido
0.6
0.4
0.2
0.0
Control
Estrés
F
Clorofila A + clorofila B (tejido seco)
Clorofila A + B (mg)/ g tejido
20
15
10
5
0
Control
Estrés
G
Clorofila A/ clorofila B
Clorofila A/ clorofila B
3.2
3.0
2.8
2.6
2.4
2.2
Control
Estrés
WT
OE1
OE5

Figura 26. Contenido de clorofila A y B . Se tomaron discos de hojas de plantas OE1, OE5 y WT crecidas en condiciones control de crecimiento (control) y condiciones de déficit hídrico (estrés), al día 18 de déficit hídrico (WC 15%). Se analizó el contenido de clorofila mediante el método de Wolken & Schwertz, 1953. **A.** Contenido de clorofila A por mg de tejido fresco. **B.** Contenido de clorofila B por mg de tejido fresco. **C.** Contenido de clorofila A por mg de tejido seco. **D.** Contenido de clorofila B por mg de tejido seco. **E.** Contenido de clorofila total (A+B) por mg de tejido fresco. **F.** Contenido de clorofila total (A+B) por mg de tejido seco. **G.** Contenido de clorofila A en función del contenido de clorofila B por mg de tejido. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre plantas OE y WT con un p-valor < 0,05.

En las Fig. 23, 24 y 25 podemos observar que no hay diferencias muy marcadas en cuanto a la acumulación de especies reactivas del oxígeno y peroxidación lipídica entre las plantas OE y las WT. La línea OE5 parece un poco más susceptible a la acumulación de superóxido, al menos en las condiciones de estrés más severo (WC 15 %). A pesar del efecto negativo que representa la acumulación de estas sustancias, el resultado es congruente con lo observado en la Fig. 21, ya que la sobrevida de la línea OE5 es menor que la de los otros genotipos y por tanto es esperable que presenten mayores señales de daño celular.

En las Fig. 26 C y D se puede observar que no hay diferencias significativas en el contenido de clorofila A y B entre las líneas OE y las plantas WT. Tampoco se ven diferencias de contenido de clorofila entre la condición control y la condición de déficit hídrico. Las diferencias de contenido de clorofila entre la condición control y condición de déficit hídrico en muestras de tejido fresco que se ven en las imágenes A y B se deben a las diferencias de contenido de agua de las plantas en las diferentes condiciones de crecimiento. Dado que las plantas expuestas a déficit hídrico presentan menor contenido de agua, el contenido de clorofila por mg de tejido es mayor. Al observar el contenido de clorofila total (clorofila A + clorofila B) podemos observar el mismo patrón. No se ven diferencias significativas en el contenido de clorofila total entre plantas expuestas a condiciones de déficit hídrico y plantas control, como tampoco hay diferencias entre genotipos (imagen F). En la imagen G se puede observar que en condiciones de déficit hídrico las plantas tienden a presentar un cociente menor de clorofila A/B, siendo esta diferencia estadísticamente significativa solamente en el genotipo OE5. Parecería haber una tendencia de las líneas OE a presentar cocientes mayores a las plantas WT tanto en condiciones control como condiciones de déficit hídrico, aunque las diferencias tampoco son estadísticamente significativas.

Teniendo en cuenta todos los resultados de los ensayos de déficit hídrico, se propone que la sobre-expresión del gen *GmDIAT* en plantas de *Arabidopsis* podría mejorar la tolerancia de las plantas a condiciones de déficit hídrico. A pesar de que la sobrevida de las distintas líneas fue variable dependiendo de las condiciones del ensayo, se pudo observar que el rendimiento de la línea OE1 es considerablemente mayor al de las plantas WT, generando un 30% más de semillas en función del peso de la cosecha. Además, la pérdida del contenido de agua del sustrato fue similar para todos los genotipos utilizados, y la línea OE1 presentó mejor performance en cuanto a los valores de Fv/Fm tomados a lo largo del ensayo. Esto sugiere que la línea OE1 puede mantener el funcionamiento del sistema fotosintético durante más tiempo en condiciones de déficit hídrico. Por otro lado, no se observaron cambios en la acumulación de especies reactivas del oxígeno, peroxidación lipídica ni contenido de clorofila entre las líneas sobre-expresantes y las plantas WT. En conjunto estos resultados sugieren que la sobre-expresión de *GmDIAT* podría promover un mejor desempeño de las plantas en condiciones de déficit hídrico.

Expresión de *TOR* en plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT*

En vista de que la sobre-expresión de *GmDIAT* promueve la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés osmótico, nos preguntamos qué rol podría cumplir la acumulación de BCAAs en las plantas sobre-expresantes. Dado que el sistema TOR promueve el crecimiento de las plantas, y se ha reportado que es modulado por los BCAAs, analizamos la expresión de *TOR* en las líneas de Arabidopsis sobre-expresantes de *GmDIAT* y en plantas WT. Los resultados pueden observarse en la Fig. 27.

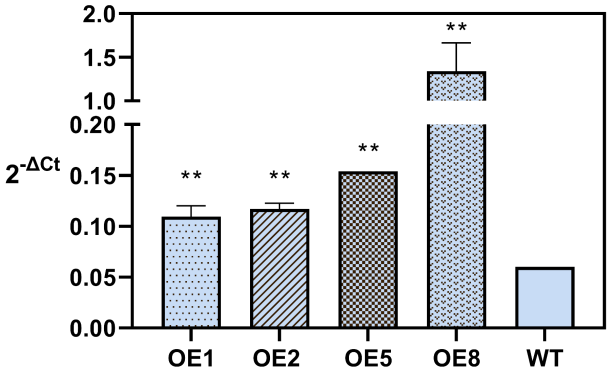


Figura 27. Expresión de *TOR* en líneas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT.* Evaluación de la expresión de *TOR* (AT1G50030) mediante qPCR en las líneas sobre-expresantes de *GmDIAT* (OE1, OE2, OE5 y OE8). Se reporta el $2^{-\Delta CT}$ para cada línea sobre-expresante, donde $\Delta CT = CT_{TOR} - CT_{Actina}$. Cebadores utilizados para *TO*R: Fw-AtTOR y Rv-AtTOR. Cebadores utilizados para la actina: F-AtAct2_qPCR y R-AtAct2_qPCR. Diferentes asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas entre la líneas OE y las plantas WT: ** p-valor < 0.0045.

En la Fig. 27 puede observarse que todas las líneas sobre-expresantes del gen *GmDIAT* presentan una mayor expresión de *TOR* que las plantas WT, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, no se observa una correlación entre los niveles de expresión de *GmDIAT* (Fig. 14) y *TOR* en las líneas sobre-expresantes.

Discusión

La soja es uno de los cultivos agronómicos de mayor relevancia a nivel mundial y nacional, tanto por superficie de siembra, como por su amplia utilización para la alimentación humana y animal (FAO, 2021). El déficit hídrico es uno de los principales factores que determina la cantidad y calidad de grano producido, y es un problema difícil de sortear, ya que depende de las características climatológicas de cada año. Se ha reportado que los eventos de sequía generan grandes pérdidas del rendimiento de cultivo de soja, dando lugar a caídas de hasta un 60% del rendimiento, lo cual afecta gravemente el mercado de la soja y genera grandes pérdidas económicas (INIA, 2012). Se prevé que los eventos de sequía pueden ser cada vez más frecuentes dado el contexto de cambio climático, lo cual, sumado a la necesidad de producir alimentos para una población mundial que continúa creciendo, constituye uno de los principales desafíos para el cultivo de soja. El crecimiento del cultivo de soja se ha visto asociado al incremento de superficie utilizada para su cultivo, sin

embargo, y a diferencia de lo que ha ocurrido con otros cultivos de interés agronómico como el trigo y el maíz, el rendimiento por área de cultivo no ha cambiado significativamente en las últimas décadas (Liu *et al.,* 2020). La tolerancia al déficit hídrico es una característica compleja, que ha tenido un éxito limitado en los programas de mejoramiento de soja, dado que los recursos genéticos provenientes de genotipos adaptados son limitados. A la fecha, son pocos los genes que han demostrado ser clave para mejorar la tolerancia a la sequía en soja, siendo las líneas de marchitamiento lento las primeras fuentes descritas de tolerancia al estrés hídrico en soja (Carter *et al.*, 2003). En este contexto, resulta evidente la necesidad de ahondar en el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la respuesta de las plantas de soja frente al déficit hídrico, con el fin de generar herramientas que permitan incrementar la tolerancia de las plantas de soja frente al déficit hídrico.

Recientemente se ha reportado que la acumulación de BCAAs forma parte de las respuestas de tolerancia al déficit hídrico en plantas (Bowne *et al.*, 2012; Templer *et al.,* 2017; Shim *et al.*, 2023, Wang *et al.,* 2024). Sin embargo, existen pocos trabajos que logren incrementar los niveles de estos aminoácidos mediante ingeniería genética, debido a la compleja regulación de retroalimentación en las vías de biosíntesis y degradación de BCAAs (Chen *et al.,* 2010; Gu *et al.*, 2010; Peng *et al*., 2015; Xing & Last, 2017). Por lo tanto, identificar genes candidatos que permitan aumentar el contenido de BCAAs de las plantas facilitará el desarrollo de cultivos con mayor tolerancia al estrés ambiental.

Familia de genes BCAT y DIAT-like

En este trabajo se identificó un gen de soja (Glyma.12G226400), nombrado aquí *GmDIAT* (*Glycine max* Drought Induced Aminotransferase), que codifica una proteína perteneciente a la familia de aminotransferasas que participan en la síntesis de BCAAs en plantas. Este gen fue seleccionado para su estudio por presentar una alta homología de secuencia con *OsDIAT*, un gen de arroz inducible por déficit hídrico cuya sobre-expresión en arroz (Shim *et al.,* 2023) y soja (comunicación personal) confiere tolerancia en las plantas frente a la sequía. Se propone que OsDIAT participa en la síntesis de BCAAs dado que presenta actividad catalítica *in vitro*, y que su expresión promueve la acumulación de BCAAs en plantas. El análisis de datos transcriptómicos del laboratorio, provenientes de diferentes genotipos de soja expuestos a condiciones de estrés hídrico, así como datos disponibles en bases de datos (Fig. 7) muestran que, en soja, *GmDIAT* se induce fuertemente frente a condiciones de déficit hídrico, lo cual fue confirmado experimentalmente en este trabajo.

Se han identificado y caracterizado enzimas BCAT en distintas especies de interés agronómico como plantas de arroz, trigo, cebada y tomate, así como en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Las BCATs son aminotransferasas que participan en el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, y se ha observado que pueden catalizar tanto la síntesis como la degradación de BCAAs, utilizando α-cetoácidos de cadena ramificada o BCAAs como sustratos (Diebold *et al*., 2002; Binder, 2010). La afinidad por los sustratos y la velocidad de catálisis hacia un lado u otro de la reacción es particular de cada enzima, habiendo una correlación entre la localización subcelular de las BCAT y su capacidad catalítica (Taylor *et al*., 2004; ; Binder, 2010). A su vez, se ha evidenciado que cada enzima tiene distinta afinidad por diferentes sustratos (Val, Leu, Ile o sus derivados), teniendo un rol más importante en la síntesis/degradación de aminoácidos específicos (Knill *et al.*, 2008;

Schuster *et al.,* 2006; Lächler *et al.,* 2015). También se ha observado que el patrón espacio-temporal en que se expresan las BCATs es específico de cada enzima, lo cual podría determinar el rol de cada una en el metabolismo de BCAAs, siendo algunas proteínas importantes para el mantenimiento de las concentraciones de BCAAs en condiciones normales de crecimiento; mientras que otras BCATs pueden tener un rol importante en la respuesta de las plantas frente a diversas condiciones ambientales (Urano *et al*., 2009; Schuster & Binder, 2005; Huang & Jander, 2017).

En *Arabidopsis* la familia de BCATs está compuesta por 7 genes, que codifican a 6 proteínas (BCAT1-6), siendo el gen *BCAT7* un pseudogen. Todas las BCATs de *Arabidopsis* excepto BCAT4 son capaces de complementar cepas de *Saccharomyces* deficientes para la síntesis de BCAAs, permitiendo su crecimiento en ausencia de BCAAs exógenos (Diebold *et al*., 2002). Las BCAT1 y BCAT2 de *Arabidopsis* son enzimas de localización mitocondrial, y se propone que participan en la degradación de BCAAs (Angelovici *et al.,* 2013; Schuster & Binder, 2005). BCAT1 se expresa en todos los tejidos a excepción de raíces, con transcripción predominante en plántulas y hojas, y presenta una respuesta muy baja a estímulos externos como la falta de luz y el déficit energético, lo cual es observado para el resto de enzimas que participan en la degradación de BCAAs. Debido a eso, se propone que BCAT1 participa principalmente en la degradación de BCAAs en condiciones favorables de crecimiento (Binder, 2010). Por otro lado, BCAT2 tiene una expresión basal baja y se induce fuertemente en respuesta a la acumulación de ABA (Urano *et al.*, 2009), a condiciones de falta de carbono (Schuster & Binder, 2005), y frente a condiciones de estrés salino (Joshi *et al*., 2010). En línea con estos datos, se reportó que la sobre-expresión de BCAT2 en plantas de *Arabidopsis* disminuye significativamente el contenido de BCAAs en condiciones de estrés por manitol, pero no en condiciones normales de crecimiento, por lo que se propone que BCAT2 es una enzima catabólica y su función podría ser principalmente importante en condiciones de estrés (Huang & Jander, 2017). Las BCAT3 y BCAT5 se han reportado de localización cloroplástica, aunque algunos estudios han encontrado a BCAT5 en fracciones mitocondriales (Diebold *et al*., 2002; Taylor *et al*., 2004; Zybailov *et al.*, 2008), y su participación en el metabolismo de BCAAs no está muy caracterizada (Schuster & Binder*,* 2005). Por otro lado, se ha observado que plantas de *Arabidopsis knock out* para *BCAT3* presentan una menor acumulación de BCAAs, principalmente de Val (Knill *et al.,* 2008), lo cual apoya la idea de que BCAT3 participa en la biosíntesis de BCAAs y principalmente de Val. *BCAT3* y *BCAT5* se expresan en niveles bajos en condiciones normales de crecimiento (Schuster *et al.,* 2006). Las proteínas BCAT4 y BCAT6 son enzimas de localización citosólica, y su participación en el metabolismo de BCAAs no está muy clara. En ensayos *in vitro* se ha observado que BCAT6 es capaz de transaminar Val, Leu e Ile, así como sus correspondientes 2-oxoácidos, con una mayor afinidad por 3MOP precursor de Ile, sin embargo, mutantes *knock out* para *BCAT6* no presentan diferencias significativas en la acumulación de BCAAs (Lächler *et al.,* 2015). En el caso de BCAT4, ésta presenta una actividad marginal con Leu y ninguna actividad con Val e Ile, y plantas de *Arabidopsis* mutantes para *BCAT4* no presentan cambios en los niveles de BCAAs (Schuster *et al.,* 2006).

Una de las características de las enzimas BCAT es su promiscuidad, ya que se ha reportado que presentan una variedad de sustratos. En este sentido, se evidenció que BCAT1 además de iniciar la degradación de todos los BCAAs, tiene afinidad por el α-aminobutirato, α-cetobutirato, así como metionina y α-cetometiltiobutirato (Schuster &

Binder, 2005); y que BCAT3 a pesar de presentar una fuerte preferencia por los oxoácidos correspondientes a los tres BCAAs, presenta afinidad por los α-cetoacidos de Met y derivados de Met (Knill *et al.,* 2008). La BCAT4 de localización citosólica es un ejemplo particularmente interesante, dado que presenta afinidad por Met y su 2-oxoácido correspondiente (MTOB) y parece haber perdido su función original en el metabolismo de BCAAs, observando que plantas de *Arabidopsis* mutantes para BCAT4 no presentan cambios en los niveles de BCAAs pero sí una pérdida de un 50 % en la acumulación de glucosinolato alifático derivado de Met (Schuster *et al.,* 2006). BCAT6 también presenta afinidad por Met y MTOB, aunque menor que para los oxoácidos correspondientes a los BCAAs, y se ha evidenciado que mutantes de *Arabidospsis* con pérdida de función para *BCAT6* y *BCAT4* acumulan una mayor cantidad de 5′-desoxi-5′-metiltioadenosina, un intermedio de la vía de reciclaje de Met, que mutantes simples para BCAT4, lo cual sugiere que ambas enzimas son importantes en el metabolismo de Met. (Lächler *et al.,* 2015). La expresión espacio temporal de *BCAT3* y *BCAT4* es similar para ambos genes, es basalmente baja pero se induce frente a heridas, principalmente en los haces vasculares y floema, un patrón típico de genes implicados en la formación de glucosinolatos derivados de Met (Knill *et al.,* 2008). Se propone que BCAT4 cataliza el paso inicial de elongación de la cadena Met al convertir Met en MTOB, y que la BCAT3 podría participar tanto en el inicio de la elongación, como en los pasos terminales, dando lugar a glucosinolatos de cadena corta derivados de metionina (Knill *et al.,* 2008).

El hecho de que la mayoría de BCATs presenta afinidad por Met o sus derivados, y que algunas BCATs modulan la acumulación de glucosinolatos en especies vegetales es interesante y evidencia la promiscuidad de estas enzimas, así como la existencia de una estrecha relación evolutiva entre la vía de síntesis de glucosinolatos derivados de Met y la biosíntesis de BCAAs (Schuster *et al.,* 2006). A su vez, el hecho de que las dos BCATs citosólicas de *Arabidopsis* participen en la vía de síntesis de glucosinolatos pero no parecen cumplir un rol en al síntesis de BCAAs es peculiar y hace interesante el estudio de las enzimas BCATs citoplasmáticas.

En soja hay 8 genes que codifican proteínas asignadas como BCATs en la base de datos PhytoZome: Glyma.04G049200 de localización predicha mitocondrial; Glyma.11G045300 y Glyma.01G196300 de localización cloroplástica; Glyma.08G063300, Glyma.08G063000, Glyma.07G186000 citosólicas; Glyma.07G186100 cloroplástica/ citosólica y Glyma.06G050100 citosólica/ mitocondrial. Ninguno de estos genes corresponde a aquellos que muestran mayor homología de secuencia con OsDIAT (Glyma.12G226400, Glyma.06G082700 y Glyma.17G19080, (Fig. 6). Sin embargo, datos experimentales muestran que este tipo de aminotransferasas tienen actividad BCAT *in vitro* e *in vivo* (Shim *et al.,* 2023).

El grupo de Do *et al.,* 2022 mostró que en plantas de soja expuestas a condiciones de déficit hídrico se inducen los genes codificantes para BCATs de localización predicha mitocondrial, Glyma.04G049200 y Glyma.06G050100; mientras que no decectó la inducción de los genes codificantes a las proteínas cloroplasticas Glyma.11G045300 y Glyma.01G196300, ni tampoco para el gen codificante la proteínas citoplasmática Glyma.08G063300. En línea con estos resultados, el grupo de Sainz *et al.*, 2023 observó una inducción de Glyma.06G050100 en condiciones de déficit hídrico. Además, estudios anteriores de Do *et al.,* 2022 mostraron que Glyma.04G049200 se induce en condiciones de

déficit energético, lo cual se correlaciona temporalmente con la inducción de procesos autofágicos inducidos por estrés (Yuasa *et al*., 2013). A su vez, el grupo de Wang *et al.,* 2024, observó que el genotipo de soja N44 acumula en raíces una mayor cantidad de Val e Ile que el genotipo N65, el cual presenta un fenotipo más susceptible al estrés, y observaron una expresión diferencial del gen Glyma.08G063300 el cual codifica a la BCAT7 de localización predicha citosólica, observando una correlación negativa con la acumulación de Ile en el genotipo N44, más resistente al estrés. En conjunto estos resultados sugieren que que el catabolismo de los BCAAs, mediado por la expresión de BCATs, desempeña un rol crucial en la respuesta de la soja a condiciones de déficit hídrico y energético.

Curiosamente, se reportó que Glyma.06G050100 es blanco de la proteasa CPR1 del nemátodo *Heterodera glycines*, el cual actúa como un factor de patogenicidad aumentando la susceptibilidad de la plantas a la infección bacteriana, lo cual indica que la proteína codificada por Glyma.06G050100 podría participar en la respuesta de las plantas frente a patógenos, lo cual no ha sido descrito para otras BCATs hasta el momento (Margets *et al.,* 2024).

En este contexto, los datos de RNAseq obtenidos en nuestro laboratorio muestran patrones de inducción del gen Glyma.01G196300 codificante para una proteínas de localización predicha cloroplástica y una represión del gen Glyma.07G186000 codificante para una proteínas de localización predicha citoplasmática, en plantas de soja expuestas a déficit hídrico. El hecho de que se induzca Glyma.01G196300 sugiere que bajo condiciones de déficit hídrico también se inducen enzimas BCAT que participan en la síntesis de BCAAs.

Durante la búsqueda de genes homólogos a *OsDIAT*, se observó que tanto *OsDIAT* como los genes homólogos en arroz, soja, y *Arabidopsis*, a pesar de presentar homología con BCATs reportadas y dominos aminotransferasa, están asignadas en algunas bases de datos a la vía de síntesis de folato (Fig. 28).

La síntesis de folatos en plantas es un proceso complejo que se da en tres compartimentos celulares. Los folatos son moléculas tripartitas formadas por una unidad de pterina, un p-aminobenzoato (pABA), y una cadena de glutamato de uno a ocho residuos. El pABA se forma a partir del corismato en los plastidios, la pterina de GTP en el citosol, y ambos son transportados a la mitocondria en donde se dan los siguientes pasos de reacción. La enzima folilpoliglutamato sintetasa que alarga la cadena de glutamato se ha encontrado en el citosol, las mitocondrias y los plastidios, lo cual sugiere un tráfico complejo de THF entre los compartimentos (muy probablemente en forma de monoglutamato y sus precursores) entre los orgánulos y el citosol (Bedhomme *et al.*, 2005). La síntesis de pABA a partir de corismato se da a través de dos reacciones enzimáticas, siendo la aminodeoxicorismato liasa (ADSL) la enzima que cataliza el segundo paso, dando lugar a la conversión de 4-amino-4-deoxicorismato en pABA (Gorelova *et al.,* 2017). Tanto OsDIAT como sus proteínas homólogas son asignadas a este paso de la síntesis de folato, catalizando la conversión de 4-amino-4-deoxicorismato en pABA (Fig. 28).

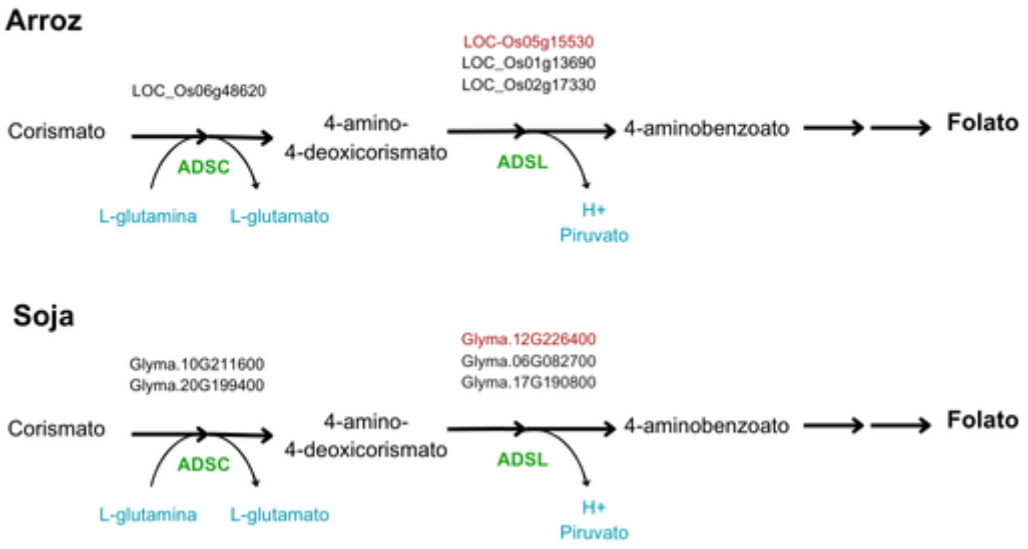


Figura 28. Representación de la vía de síntesis de folato en arroz y soja. El corismato y la L-glutamina son convertidos a 4-amino-4-deoxicorismato y glutamato en una reacción catalizada por la aminodeoxicorismato sintasa (ADCS). Posteriormente, el 4-amino-4-deoxicorismato es convertido a 4-aminobeanzoato en una reacción catalizada por la aminodexicorismato liasa (ADCL).

El análisis filogenético de la proteínas OsDIAT, sus homólogas en arroz, soja y *Arabidopsis* así como con las BCATs reportadas en *Arabidopsis* y descritas en soja mostró que el gen *OsDIAT* se encuentra en un grupo separado de las BCATs reportadas, y en el mismo grupo que sus proteínas homólogas. Esto es interesante, ya que se ha reportado actividad aminotransferasa *in vitro* para OsDIAT con los tres BCAAs, y se ha evidenciado que la sobre-expresión del gen *OsDIAT* en arroz aumenta la acumulación de BCAAs *in vivo*, sugiriendo que OsDIAT participa efectivamente en la biosíntesis de BCAAs (Shim *et al.*, 2023). Estos resultados son coherentes con los resultados obtenidos para *GmDIAT* (Glyma.12G226400), que muestran que la sobre-expresión de este gen en *Arabidopsis* incrementa los niveles de BCAAs, principalmente Leu e Ile (Fig. 16).

Hasta el momento no se ha reportado que las enzimas BCATs participen en el metabolismo de folato, sin embargo, el hecho de que *OsDIAT* y sus homólogos presentan similitud a enzimas ADSL y se encuentran filogenéticamente separadas de las BCATs reportadas, abre la pregunta de sí estas enzimas pueden participar tanto en el metabolismo de BCAAs como en el metabolismo de folato. Dado que las BCATs son enzimas que presentan un variado repertorio de sustratos, y participan en la síntesis de glucosinolatos derivados de metionina, así como otros aminoácidos no proteinogénicos (Knill *et al.*, 2008; Schuster *et al.,* 2006; Binder, 2010), es posible que las proteínas del grupo de OsDIAT puedan tener un repertorio de sustratos más amplio, participando en otras vías metabólicas. Sin embargo, sería necesario estudiar la actividad catalítica de las enzimas para comprobar su afinidad por los precursores de folato, así como evaluar el efecto que esto pudiera tener en las plantas. En particular, OsDIAT y GmDIAT presentan localización citosólica, mientras que la síntesis de pABA está reportada en cloroplasto, por lo que sería interesante estudiar las implicancias de este tipo de actividad en el contexto celular.

En el caso de que OsDIAT y sus homólogos participen en la síntesis de folato podría contribuir a la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés ambiental, dado que los folatos participan en la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y actúan como donadores y aceptores en reacciones de metilación, y se ha reportado que la aplicación foliar de folatos promueve la tolerancia de las plantas al estrés salino y al déficit hídrico incrementando el contenido de clorofilas, aminoácidos, azúcares, el contenido de agua de las plantas y disminuyendo los ROS y el daño oxidativo (Alsamadany *et al.*, 2022; Khan *et al.,* 2022; Ibrahim *et al.,* 2020).

Como se mencionó anteriormente la mayoría de las BCATs reportadas presenta afinidad por los tres BCAAs, con sus correspondientes oxoácidos, así como con Met y glucosinolatos derivados de Met. Sin embargo, la capacidad catalítica y la función que cumplen las BCATs en el metabolismo de BCAAs se ha visto estrechamente vinculada a su localización subcelular. De esta manera, las enzimas cloroplásticas participan en la síntesis de BCAAs, mientras que las enzimas mitocondriales participan en la degradación de los mismos. Con el fin de esclarecer el rol de GmDIAT en el metabolismo de BCAAs, en este trabajo se analizó la localización intracelular de la proteína mediante la expresión en *Arabidopsis* de *GmDIAT* como fusión a GFP. La observación de hojas y protoplastos de plantas transgénicas mediante microscopía confocal de fluorescencia confirmó que, al igual que OsDIAT, GmDIAT presenta localización citosólica (Fig. 15).

Si bien se han reportado BCATs de localización citosólica, la participación de estas enzimas en el metabolismo de BCAAs en plantas es controversial (Binder, 2010; Buffagni *et al.,* 2020; Maloney *et al.,* 2010; Diebold *et al.,* 2002; Graham & Eastmond 2002). De hecho, las BCAT citosólicas de *Arabiodopisis* no parecen participar en el metabolismo de BCAAs (Schuster *et al.,* 2006; Lächler *et al.,* 2015), y lo mismo se observa para la BCAT citosólica de tomate *SlBCAT5*, la cual se ha reportado incapaz de complementar cepas de *E.coli* autotróficas para BCAAs (Maloney *et al.*, 2010).

En este contexto, el hecho de que OsDIAT y GmDIAT presentan localización citosólica (Shim *et al.*, 2023, Fig. 15) y que ambas enzimas promueven la acumulación de BCAAs *in vivo* (Shim *et al.*, 2023, Fig. 16), indica que la síntesis de BCAAs en algunas condiciones podría depender de algunas reacciones enzimáticas que tienen lugar en el citosol y están catalizadas por enzimas con relativamente baja homología con las BCAT de secuencia canónica (Fig. 6), pero que aún así muestran actividad BCAT (Shim *et al.*, 2023, Fig.16).

Efectos de la sobre-expresión de genes DIAT-like en especies vegetales

La sobre-expresión de *OsDIAT* en plantas de arroz, mediada por la introducción del gen bajo la regulación de un promotor constitutivo, genera un aumento considerable en la acumulación de los tres BCAAs en condiciones normales de crecimiento y esta diferencia es aún mayor en plantas sometidas a un estrés por déficit hídrico generado por *air drying.* Además, la acumulación de Val y Leu es mayor que de Ile en ambas condiciones de crecimiento (Shim *et al.,* 2023).

En el presente trabajo se generaron plantas *de Arabidopsis* sobre-expresantes de *GmDIAT* para evaluar el rol de este gen en el metabolismo de BCAAs y en la tolerancia al estrés abiótico. Resultados preliminares mostraron que las plantas transgénicas acumulan

mayores niveles de BCAAs, principalmente de Ile y Leu, respecto a plantas WT, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas (Fig. 16). El hecho de que las plantas sobre-expresantes de GmDIAT presenten una mayor acumulación de Leu e Ile pero no de Val, podría estar explicado por una afinidad diferencial de GmDIAT por los diferentes sustratos. Sin embargo, se necesitan más réplicas biológicas para confirmar los resultados aquí reportados y evidenciar la relación entre la expresión del gen *GmDIAT* y la acumulación de BCAAs en plantas de *Arabidospsis*. A su vez, será necesario monitorear la acumulación de BCAAs en las plantas transgénicas y WT sometidas a condiciones de déficit hídrico, dado que para OsDIAT, se observó que en condiciones de estrés se amplían las diferencias entre las plantas transgénicas y el WT en términos de acumulación de BCAAs (Shim *et al.,* 2023). Se ha postulado que este tipo de enzimas citosólicas con actividad BCAT podrían regular procesos de desarrollo específicos o respuestas al estrés (Binder, 2010; Maloney *et al.,* 2010), y el presente trabajo así como el trabajo de Shim *et al.,* 2023 respaldan la idea de que BCATs citosólicos podría regular la biosíntesis de BCAA en condiciones de estrés.

Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de *GmDIAT* en plantas de *Arabidopsis* expuestas a condiciones de estrés abiótico se realizaron ensayos de germinación y crecimiento *in vitro*, así como ensayos de deshidratación en tierra.

Ensayos de fenotipado *in vitro* mostraron que la sobre-expresión de *GmDIAT* mejora la tasa de germinación en condiciones de alta salinidad (100 mM NaCl) o de estrés osmótico (250 mM manitol), de las semillas de *Arabidopsis* transgénicas con respecto a las semillas de plantas WT (Fig. 17). Además se observó que las líneas sobre-expresantes acumulan una mayor biomasa total respecto a las plantas WT al ser crecidas en ambas condiciones estrés, sin observarse diferencias significativas en el crecimiento de las raíces de las plantas (Fig. 18 y 19). Tanto el aumento de la tasa de germinación como de biomasa de las plantas transgénicas, se correlaciona con los niveles de expresión del transgén (Fig. 17 y 14). La línea OE1 tiene mayor expresión de GmDIAT, parecería acumular una mayor cantidad de Ile y Leu, y mostró un mayor porcentaje de germinación en condiciones de estrés que la línea OE5, y más aún que las plantas WT. Teniendo en cuenta que la expresión de *GmDIAT* en soja se induce bajo condiciones de estrés salino e hídrico (Fig.7 y Fig. 9), estos resultados sugieren que GmDIAT podría cumplir un rol relevante en la respuesta al estrés hídrico en soja.

Ensayos de deshidratación en tierra de las plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* permitieron observar que la cinética de pérdida de agua de las linea OE es muy similar a la de las líneas WT, lo cual sugiere que la sobre-expresión del gen *GmDIAT* no genera grandes cambios en el consumo de agua y la transpiración de las plantas (Fig. 20 y Fig. 21). Para evaluar el desarrollo de los síntomas del estrés por sequía se determinó el contenido de clorofila y la máxima eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm). Estos parámetros están relacionados con la función de los cloroplastos y comúnmente se asocian con el diagnóstico de la senescencia de las hojas (Oh *et al.,* 1996), así como con el estado de estrés hídrico (Woo *et al.,* 2008). Tras el cese del riego, se observó una disminución en el parámetro Fv/Fm en plantas de las líneas OE y plantas WT, aumentando el número de plantas con valores menores al fisiológico a medida que el estrés se hizo más severo (Fig. 20). Se observó que la línea OE1 mantiene valores de Fv/Fm durante más tiempo, lo cual está asociado a su vez con una mayor turgencia de las hojas, lo cual sugiere que la sobre-expresión de *GmDIAT* en la línea OE1 retrasa el daño celular y de los cloroplastos,

producido como consecuencia del estrés. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila A y B entre líneas OE y WT, ni en condiciones de estrés ni condiciones control de crecimiento (Fig. 26). Según se ha reportado en la bibliografía, en condiciones de estrés las plantas suelen tener menores contenidos de clorofila A y clorofila B, debido a procesos de senescencia y degradación de los cloroplastos. A su vez, la clorofila B disminuye más rápidamente que la clorofila A, por la cual las plantas expuestas a condiciones de deshidratación tienden a presentar cocientes de clorofila A/B mayores que las plantas crecidas en condición control. Por esta razón suele asociarse un menor incremento del cociente de clorofila A/B a plantas que presentan una mayor tolerancia al estrés (Guo *et al.,* 2016). En los ensayos de estrés hídrico no se observaron diferencias significativas en el contenido de clorofila A y B entre condición control y condición de estrés hídrico para ningún genotipo. A su vez, contrario a lo reportado, los cocientes de clorofila A/B fueron menores en condición de estrés hídrico respecto a la condición control para todos los genotipos (Fig. 26). Los resultados obtenidos son peculiares ya que la tendencia parecería apuntar a una mayor cantidad de clorofila B respecto a la clorofila A, y un aumento en los contenidos de clorofila en condiciones de estrés. Esto último podría ser un artefacto debido al grado de deshidratación del tejido analizado que podría estar afectando el peso fresco y peso seco de las muestras.

En condiciones de déficit hídrico, las plantas reciben más luz de la que pueden utilizar para la síntesis de fotoasimilados, lo cual suele llevar al daño de los fotosistemas y la generación de ROS (Nadarajah *et al.*, 2020; Cruz *et al*., 2008; Dinakar *et al.*, 2012). En este contexto la acumulación de ROS como los el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($OH^{\bullet}$) y oxígeno singulete ($^1O_2$) puede ser utilizada como indicador del estrés oxidativo celular y del estrés hídrico en las plantas.

Las plantas sobre-expresantes de *GmDIAT* no presentan grandes diferencias en la acumulación de especies reactivas del oxígeno y peroxidación lipídica en comparación con plantas WT, ni en condición control de crecimiento ni en déficit hídrico (Fig. 23, 24 y 25). Esto indica que las diferencias observadas en los valores de Fv/m así como el estado morfológico de las plantas entre las líneas OE y plantas WT no estaría dado, al menos en principio, por diferencias en el estado oxidativo celular. Dado que la acumulación de ROS está asociada al daño de macromoléculas y al estrés celular en condiciones de déficit hídrico, y teniendo en cuenta que la sobre-expresión de *GmDIAT* mejora la performance de las plantas en estas condiciones, se podría haber esperado encontrar una menor acumulación de ROS y peroxidación lipídica en las plantas OE. Sin embargo, dado que las técnicas utilizadas tienen baja sensibilidad es posible que existan diferencias más pequeñas que no pueden ser discriminadas mediante estas técnicas.

Con el fin de evaluar la capacidad de recuperación de las plantas en los ensayos pequeños de deshidratación, se restableció el riego al llegar el sustrato a un 4-13% de su capacidad de retención de agua. Se evaluó la sobrevida de las plantas, siendo mayor la recuperación de la línea OE1 con un 38 % de sobrevida**,** respecto a un 25% para OE5, y un 13 % para las plantas WT (Fig. 20). Si bien se observó variabilidad entre los distintos ensayos realizados, cabe destacar que los ensayos no son totalmente comparables entre sí dado que el tamaño de las plantas y las condiciones de deshidratación fueron distintas. A pesar de haber llegado a niveles similares de contenido de agua del sustrato en el ensayo grande la cinética de pérdida de agua del sustrato fue más lenta y las plantas tardaron más tiempo en mostrar los efectos del estrés. Mientras que en el ensayo pequeño (Fig. 20) el contenido de agua del sustrato disminuyó al 10% en 16 días, en el ensayo grande el contenido de agua del sustrato

disminuyó al 12% en 20 días (Fig. 21). Estas diferencias en la pérdida de agua del sustrato podrían deberse a que las plantas eran más grandes al momento de comenzar el ensayo. Igualmente, en términos generales, el porcentaje de sobrevida de las plantas en estos ensayos se condice con lo observado por Woo & Pogson, 2008 que reportaron que las plantas de *Arabidopsis* generalmente pueden recuperarse de situaciones graves de estrés por sequía siempre que el valor Fv/Fm no se reduzca a valores inferiores al 30% del valor fisiológico (normalmente 0,8). A partir de estos resultados podemos decir que las líneas OE presentan mejores niveles de recuperación que las plantas WT, siendo la línea OE1 aquella que presenta mayor expresión de *GmDIAT*, mayores niveles de BCAAs y una mayor tolerancia a las condiciones de déficit hídrico. Estos resultados van en línea con los datos reportados por Shim *et al.,* 2023, en donde observaron en ensayos de deshidratación que las plantas de arroz sobre-expresantes del gen *OsDIAT* presentan menos síntomas de deshidratación como el marchitamiento, el enrollamiento de hojas y la clorosis que las plantas WT, y presentan un retraso en la caída del valor de Fv/Fm respecto a las plantas WT (día 9 en vez de día 5 de iniciado el estrés). También observaron mayores tasas de recuperación para las plantas de arroz OE luego de pasado el estrés, mostrando entre un 82-93% de recuperación luego de 7 días de rehidratación, respecto a un 40% de sobrevida en las plantas WT.

La evaluación del rendimiento de las plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* permitió determinar que la línea OE1 presenta un 130 % de rendimiento en función del peso total de las semillas, en comparación con las plantas WT al ser expuestas a condiciones de déficit hídrico, mientras que la línea OE5 presenta el mismo rendimiento que las plantas WT, siendo el rendimiento individual de cada planta similar entre las líneas OE y WT (Fig. 22 C). Se observó que, a pesar de que la sobrevida de las plantas WT fué mayor al de las plantas OE, una mayor proporción de plantas de la línea OE1 llegó a la etapa de floración y producción de semillas, por lo que se propone que el aumento del rendimiento de la línea OE1 se debe a que un mayor número de plantas pudo generar semillas luego de la recuperación del estrés. Estos resultados van en línea con los datos reportados por Shim *et al.,* 2023 en donde se observó que las líneas de arroz sobre-expresante del gen *OsDIAT* expuestas a condiciones de estrés hídrico presentan un mayor peso total de grano, una mayor tasa de llenado de grano y un mayor número de granos llenos que las plantas WT, siendo la diferencia particularmente importante en el peso total de grano de las líneas, presentando las líneas OE un rendimiento del 125-139% respecto a las plantas WT. En conjunto estos resultados demuestran que tanto la sobre-expresión de *OsDIAT* como de *GmDIAT* en especies vegetales mejora el rendimiento de grano de las plantas expuestas a condiciones de déficit hídrico.

Los resultados de este trabajo indican que la expresión de *GmDIAT* en un sistema heterólogo promueve la germinación y crecimiento de las plantas frentes a condiciones de estrés osmótico por presencia de NaCl y manitol; y podría mejorar la tolerancia de las plantas frente a condiciones de déficit hídrico, promoviendo el rendimiento de las plantas en función del peso seco de las semillas, lo cual podría tener grande beneficios a nivel agronómico.

Rol de los BCAAs en plantas expuestas a déficit hídrico

Los mecanismos de tolerancia de las plantas frente al estrés hídrico son complejos, ya que involucran una serie de cambios metabólicos, fisiológicos y morfológicos, que se basan en la participación de diversas vías de señalización, y una gran variedad de componentes celulares. Las hormonas vegetales juegan un rol importante en el desarrollo y fisiología de las plantas, y coordinan también las respuestas frente a condiciones de estrés, actuando como puente entre la detección de los estímulos y la generación de cambios adaptativos al estrés (Kumar *et al.*, 2014; Lee *et al.,* 2019; Alabadí *et al.,* 2009; Waadt *et al.,* 2022).

Es ampliamente conocido que el ABA desempeña un papel crucial en la regulación de muchos procesos de desarrollo vegetal y de respuestas al estrés, especialmente en condiciones de sequía (Belda-Palazón *et al.,* 2020; Fujita *et al.,* 2005; Choi *et al.,* 2000). El ABA puede estimular respuestas a corto plazo, como el cierre de estomas y mantenimiento del equilibrio hídrico (Tardieu, 2013), así como promover respuestas a mediano-largo plazo como la modulación del desarrollo, inhibiendo el crecimiento de brotes y promoviendo la elongación de raíces (Spollen *et al,* 2000). Además la acumulación de ABA lleva a la inducción de genes de respuesta al estrés que ayudan a paliar el estrés celular mediante la síntesis de enzimas antioxidantes, como peroxidasas y catalasas que reducen el daño oxidativo (Ahmad *et al.*, 2010; Hadiarto & Tran, 2011; Umezawa *et al.,* 2006); así como la transcripción de chaperonas, proteínas LEA que ayudan a mantener la integridad de proteínas y membranas celulares (Yu *et al.,* 2018).

Los jasmonatos (JA), son otro tipo de fitohormonas, que están ampliamente distribuidos en especies vegetales y han sido clásicamente asociados a la regulación de procesos de desarrollo como la maduración del fruto, la producción de polen y el crecimiento de raíces (Soto *et al.,* 2012; Song *et al.,* 2011; Raya-González *et al.,* 2012), así como en procesos vinculados al estrés por heridas (Koo & Howe, 2009) y la inmunidad de las plantas (Pieterse *et al.*, 2012). A pesar de que los JA se han asociado principalmente a las respuestas de estrés biótico, hace algunos años se ha observado que las plantas acumulan JA en condiciones de déficit hídrico (Creelman & Mullet, 1997, Arbona *et al.,* 2010). Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos de inducción de JA en estas condiciones y sobre su posible rol en la respuesta de las plantas frente a la sequía. Estudios recientes han revelado que la inducción de JA promueve la acumulación de ABA en condiciones de déficit hídrico en plantas de *Arabidopsis* y cítricos, sugiriendo que el JA podría tener un rol importante en la percepción y generación de respuestas en plantas sometidas a déficit hídrico (Kim *et al.,* 2009; De Olla *et al.,* 2015; De Ollas *et al.,* 2013). En este sentido, se observó que la acumulación de ABA y JA en plantas de arroz expuestas a condiciones de sequía está dada por la inducción de genes que participan en su biosíntesis, y que tanto la acumulación de ABA como la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de ABA se reducen significativamente al bloquear la acumulación de JA (Wang *et al.,* 2020). En línea con estos datos, *Arabidopsis* mutantes para JAR1 (enzima que participa en la biosíntesis de jasmonoil isoleucina (JA-Ile)), acumulan menos ABA en condiciones de déficit hídrico que plantas WT, lo cual se correlaciona con una inhibición en la expresión de NCED3 (enzima esencial en la biosíntesis de ABA) (De Olla *et al.,* 2015). En conjunto estos datos sugieren que la acumulación de JA es necesaria para la síntesis y acumulación de ABA en especies vegetales frente a condiciones de déficit hídrico, y que JA-Ile podría ser la molécula que

media la señalización dependiente de JA para la activación de vías de respuesta al estrés hídrico mediadas por ABA.

El hecho de que JA-Ile promueve la acumulación de ABA resulta interesante y podría explicar el efecto beneficioso de la acumulación de BCAAs y particularmente de Ile en plantas sometidas al déficit hídrico. En este sentido, estudios han demostrado un efecto beneficioso en la acumulación de Ile en *Cucumis melo L*, ya que han mostrado que variedades con fenotipos de resistencia al estrés osmótico acumulan una mayor cantidad de Ile que variedades más susceptibles al estrés, tanto en condiciones de estrés salino como déficit hídrico (Chevilly *et al.,* 2021). Resultados recientes del grupo del Dr. Kim (comunicación personal) apoyan esta hipótesis, dado que se observó que mutantes de arroz para la BCAT de localización predicha mitocondrial *OsBCAT2*, presentan un mayor contenido de BCAAs tanto en condiciones control como de déficit hídrico, lo cual se asocia a un mayor contenido de JA-Ile y una mejor performance de las plantas expuestas a condiciones de déficit hídrico. A su vez, observaron que las plantas mutantes presentan una menor acumulación de ROS, lo cual se asocia a la inducción de la expresión de enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasas (SOD1 y SOD2) y ascorbato peroxidasa (APX2). Teniendo en cuenta que ABA regula las respuestas de las plantas frente a condiciones de déficit hídrico, resulta evidente que la activación de la señalización por ABA mediada por JA-Ile podría ser esencial en la generación de respuestas adaptativas frente al estrés. En este sentido, una mayor acumulación de Ile podría ser clave en la percepción de las plantas al estrés para inducir respuestas mediadas por ABA.

La percepción de ABA está dada por proteínas receptoras de tipo PYR/ PYL/RCAR, lo cual da lugar a la formación de complejos ABA-PYR/ PYL/RCAR,que inhiben a las fosfatasas de la familia PP2C, lo cual permite la activación de las kinasas SnRK1 y SnRK2 (Mahmood *et al.,* 2019; Belda-Palazón *et al.,* 2020). Gran parte de las respuestas mediadas por ABA está dada por la inducción de la expresión genica mediada por SnRK1 y SnRK2 a través de la activación de factores de transcripción (TFs) de tipo bZip, MYB/MYC, NAC y AP2/ERF (Abhilasha & Choudhury, 2021). En este sentido, en *Arabidopsis* se ha reportado que bajo condiciones de déficit energético SnRK1 media la activación de TFs de tipo bZIP que inducen la transcripción de genes involucrados en la degradación de BCAAs a través de su unión a elementos G-box en los promotores. Dentro de los genes regulados por este sistema se encuentran la enzima mitocondrial BCAT2 y la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa A y B (MCCase A y B), enzima involucrada en la degradación de Leu; así como la flavoproteína de transferencia de electrones ubiquinona reductasa (ETFQO) (Pedrotti *et al*., 2018). Esto evidencia que las respuestas mediadas por ABA regulan el metabolismo de las plantas bajo condiciones de déficit energético, induciendo la expresión de enzimas catabólicas que llevan a la degradación de BCAAs, así como aumentando la capacidad de la cadena respiratoria de aceptar electrones a través de esta vía catabólica.

Se propone que la exposición de las plantas a condiciones de déficit hídrico puede dar lugar a un estado de estrés energético como consecuencia del cierre estomático y la disminución de la síntesis de foto-asimilados. En este contexto, se propone que el aumento de BCAAs producto de la degradación proteica y la biosíntesis *de novo* podría cumplir un papel importante en el mantenimiento de las condiciones celulares, siendo utilizados como fuente de energía dando lugar a la misma cantidad de energía en forma de ATP que la glucosa (Hildebrandt *et al.*, 2015). Se ha reportado que el catabolismo de BCAAs está físicamente

conectado con la cadena respiratoria por lo que puede donar electrones a través del complejo ETFQO (Taylor *et al*., 2004; Ishizaki *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2011), así como generar metabolitos que pueden pueden entrar directamente al ciclo de Krebs (Graham & Eastmond 2002). De esta manera, se propone que el efecto beneficioso de la acumulación de BCAAs en condiciones de estrés hídrico podría estar dado por la utilización de los BCAAs como fuentes alternativas de energía (Galili *et al.*, 2016). Recientemente el grupo de Sainz *et al.,* 2024 confirmó que en plantas de soja sometidas a condiciones de déficit hídrico se induce el catabolismo de BCAAs a través del aumento de expresión de enzimas IVD y BCKD, como se había observado en otras especies vegetales (Peng *et al.*, 2015; Joshi *et al.,* 2010, Fujiki *et al.,* 2002). Además, confirmaron la conexión propuesta entre la degradación de BCAAs y el balance energético celular durante el estrés hídrico en soja, al observar que en plantas sometidas a déficit hídrico aumenta la expresión de la enzima DLAT (Dihydroli-poyl transacetylase) la cual es parte del complejo de la piruvato deshidrogenasa, y es incluida dentro del "proceso catabólico de BCAA".

Teniendo estos datos en consideración, parece razonable suponer que la acumulación de BCAAs en plantas sometidas a condiciones de déficit hídrico podría ser beneficioso, dado que los BCAAs representan una fuente alternativa de energía que permite paliar el estrés energético inducido por la inhibición de la fotosíntesis en condiciones de sequía.

Se ha reportado que el ABA, además de activar las vías de degradación de BCAAs en plantas sometidas a déficit hídrico, podría estar vinculada a la acumuación de BCAAs (Urano *et al.,* 2009; Huang & Jander, 2017), así como a la expresión de enzimas que participan en su biosíntesis (Shim *et al.,* 2023). En este sentido, se ha evidenciado que *OsDIAT* presenta un perfil de expresión espacio-temporal dependiente de ABA tanto en hojas como en raíces de arroz, lo cual se corresponde con la presencia de elementos en *cis* de tipo ABRE en el promotor de *OsDIAT* (Shim *et al*., 2023). En este contexto, en este trabajo se analizó el promotor del gen *GmDIAT*, y se encontraron varios sitios de unión para TFs vinculados al estrés hídrico y particularmente elementos de respuesta a ABA, dentro de los cuales se encuentran regiones de unión para elementos bZip, MYB/MYC, NAC y AP2/ERF. Una de las secuencias de unión para TF con motivo bZip es un elemento Gbox de igual secuencia a la reportada por Pedrotti *et al.,* 2018 en los genes involucrados en la degradación de BCAAs en respuesta a ABA. Dado que la expresión de *GmDIAT* se induce en plantas de soja expuestas a condiciones de déficit hídrico, sería interesante estudiar si la regulación de la expresión de *GmDIAT* está mediada por ABA, y si participa la vía de SnRK1 tal ocurre para los genes implicados en la degradación de BCAAs.

El hecho de que en condiciones de estrés hídrico aumenta la expresión de genes involucrados en la síntesis y degradación de BCAAs es llamativo y abre la pregunta de cuál podría ser la ventaja de tener activos dos sistemas, en principio antagónicos, en un mismo contexto celular. En este sentido, la biosíntesis de BCAAs podría ser importante para mantener el balance NADP+/NADPH en los cloroplastos tal como se ha reportado para la prolina. En condiciones de déficit hídrico el ciclo de Calvin se ve disminuido como consecuencia del cierre estomático, lo cual genera que el NADPH generado en los tilacoides no puede ser regenerado a NADP+. A falta de este aceptor de electrones, y en condiciones de alta exposición a la luz, el flujo de transporte de electrones del aparato fotosintético se suprime llevando a la generación de ROS (Chaves *et al.,* 2009). Dado que la síntesis de prolina mediada por las enzimas P5CS1 y P5CR requiere de NADPH como

poder reductor, se ha propuesto que la síntesis de prolina utiliza el exceso de poder reductor generado en condiciones de estrés, reciclando el NADP+, manteniendo el balance de poder reductor y evitando el estrés por daño oxidativo en el cloroplasto (Ingrisano *et al.,* 2023). Las biosíntesis de BCAAs también requiere de NADPH en la reacción catalizada por la cetoácido reductoisomerase (KAR). Por esta razón podría ser interesante estudiar si la biosíntesis *de novo* de BCAAs en cloroplastos puede participar en el mantenimiento del balance redox NADP+/NADPH y del funcionamiento del aparato fotosintético.

Por otro lado, se ha propuesto que los BCAAs podrían actuar como moléculas señalizadoras del estrés a través de su interacción con el sistema de señalización TOR (*Target of Rapamycin*) (Heinemann *et al*., 2021). El sistema TOR es un regulador maestro evolutivamente conservado que integra información sobre la disponibilidad de nutrientes, el estado energético celular, la presencia de hormonas y la percepción del estrés, regulando el metabolismo y crecimiento en todos los eucariotas (Saxton & Sabatini, 2017; Kim & Guan, 2019; Shi *et al.,* 2018). En plantas el complejo TOR es esencial en la regulación de la proliferación celular, regulando el tamaño de las células, el metabolismo, y la síntesis de proteínas a través de la regulación de los procesos de transcripción y traducción (Caldana *et al*., 2013; Ren *et al*., 2012; Schepetilnikov *et al.,* 2013; Schepetilnikov *et al.,* 2017; Xiong *et al.,* 2013; Xiong & Sheen, 2012). Se ha reportado que TOR está asociado a la señalización por hormonas como las auxinas, citoquininas, y ABA (Li *et al.,* 2017; Chen *et al.,* 2018;, Wang *et al*., 2018; Pfeiffer *et al.,* 2016), así como por otras moléculas señalizadoras como los glucosinolatos (Malinovsky *et al.,* 2017). Estudios en plantas revelaron que TOR integra información sobre la disponibilidad de luz y azúcares, controlando la activación del meristema de raíz y brotes (Li *et al.,* 2017; Chen *et al.,* 2018; Pfeiffer *et al*., 2016; Xiong *et al.,* 2013). De esta manera, cuando los nutrientes son suficientes y las condiciones del medio ambiente son favorables, TOR promueve el crecimiento de las plantas (Dobrenel *et al.,* 2016).

Frente a condiciones de estrés, las plantas inhiben su crecimiento para maximizar la respuesta al estrés y promover su supervivencia, y luego del estrés deben rápidamente desactivar estas respuestas para poder estimular su crecimiento. Los mecanismos que subyacen a este prendido y apagado de respuestas no son conocidos en profundidad, sin embargo estudios recientes han evidenciado que existe una fuerte relación entre el sistema de señalización por ABA y el sistema TOR, de forma que la señalización TOR reprime la señalización por ABA y las respuestas al estrés en condiciones favorables de crecimiento, mientras que la señalización por ABA reprime la señalización por TOR y el crecimiento en momentos de estrés (Belda-Palazón *et al.,* 2020; Wang *et al.,* 2018; Rosenberger & Chen, 2018).

Se ha reportado que la acumulación de Ile parecería ser importante en el mantenimiento de las respuestas frente al estrés hídrico, promoviendo la acumulación de prolina en condiciones de estrés. La prolina es uno de los aminoácidos que se acumula más en condiciones de déficit hídrico promoviendo la tolerancia de las plantas frente a condiciones ambientales adversas (Frimpong *et al*., 2021; Szabados *et al*., 2010). La acumulación de prolina induce transcripcionalmente enzimas que participan en su propia degradación, lo cual permite una eliminación rápida después de aliviado de estrés. Se ha observado que este mecanismo puede bloquearse por acumulación de otros aminoácidos como la metionina e Ile, lo cual está mediado por el sistema TOR (O'Leary *et al.,* 2019). De esta

manera la acumulación de Ile podría promover el mantenimiento de las respuestas al estrés mientras las condiciones ambientales son adversas, actuando como una molécula señalizadora del estrés.

A su vez, también se ha reportado que TOR es regulado por la presencia de BCAAs (Cao *et al*., 2019; O'Leary *et al.,* 2019). En el presente trabajo se evaluó el efecto de la sobre-expresión de *GmDIAT* sobre la expresión del gen TOR (AT1G50030) en las plantas de *Arabidopsis* transgénicas (Fig. 27). Los resultados mostraron que, si bien la expresión de TOR es mayor en las plantas transgénicas que en las WT, no existe una clara correlación entre los niveles de acumulación del transcripto TOR y del GmDIAT, sugiriendo que existe algún tipo de interrelación entre estos dos parámetros pero el mecanismo que opera en este caso no es claro.

Por otro lado se ha reportado que los BCAAs son censados por el sistema TOR, dando lugar a cambios en el crecimiento y morfología de las plantas. En este sentido, Cao *et al.,* 2019 reportó que *Arabidopsis* mutantes para la IPMS1, una enzima que participa en el primer paso de síntesis de Leu, lleva a niveles elevados de Val y la inducción de la señalización por TOR. A pesar de que la inducción de TOR lleva a un retardo general en el crecimiento y desarrollo de las plantas evidenciado por un menor peso fresco y desarrollo radicular, estas presentan señales de un mayor crecimiento local, como cotiledones más largos y finos, y una mayor actividad en el meristema apical de raíces. A nivel subcelular, la sobre-acumulación de BCAAs por alimentación exógena o mutaciones en IPMS1 lleva a un severo remodelamiento del citoesqueleto de actina y de las endomembranas asociadas, lo cual se relaciona con una morfología alterada de la vacuola, el ER y el aparato de Golgi, siendo este efecto revertido por la inhibición del sistema TOR. Además las plantas mutantes presentan una alteración en la morfología ultraestructural de los cloroplasto tanto en mutantes para la IPMS como IPMI, otra enzima que participa en la vía de síntesis de Leu. Por otro lado plantas insensibles al *feedback* inhibitorio de IMPS1 que presentan una leve disminución de Val y una aumento de Leu, y plantas mutantes que presentan solamente un pequeño aumento de Val presentan un fenotipo similar a las WT. Los resultados de este trabajo muestran que la acumulación de BCAAs modula el desarrollo y crecimiento de las plantas a través del sistema TOR, y que el balance de cada uno de los aminoácidos es importante en la generación de respuestas y la fisiología de las plantas tanto en condiciones normales de crecimiento como en condiciones de estrés. Esos resultados son coherentes con nuestros resultados que sugieren que la expresión de GmDIAT y el aumento de algunos BCAAs en *Arabidopsis* incrementa la expresión de TOR y mejora la fisiología de las plantas incrementando su crecimiento y su desempeño en condiciones de estrés (Fig. 18, 22 A).

Conclusiones y perspectivas

Los ensayos previos realizados en nuestro laboratorio permitieron confirmar que las plantas de soja acumulan BCAAs bajo condiciones de déficit hídrico, principalmente en hojas, y en algunos genotipos también en raíces. A su vez, se observó que los genotipos de soja que presentan un fenotipo de marchitamiento lento acumulan una mayor cantidad de BCAAs en comparación con genotipos más susceptibles al estrés hídrico (Fig. 5). En línea con estos resultados, el grupo de Wang *et al.,* 2024 evidenció que genotipos más resistentes de soja acumulan una mayor cantidad de Val e Ile, y menos Leu en raíces que genotipos de soja

más sensibles, en respuesta a condiciones de déficit hídrico, lo cual se correlaciona con la expresión de enzimas clave en la síntesis de BCAAs (AHAS, IPMI y la (R)2-metilmalato dehidratasa que participa en la vía de generación de 2-oxobutanoato a partir de piruvato en la vía de síntesis de Ile). Esto sugiere que tanto la acumulación como el balance de los BCAAs puede tener un papel importante en la tolerancia de las plantas de soja frente a condiciones de déficit hídrico.

El estudio de genes implicados en la respuesta de las plantas de soja frente a condiciones de estrés puede proveer de herramientas para modular la tolerancia de los cultivos frente a condiciones ambientales adversas. En este sentido el estudio del metabolismo de BCAAs y su función en la respuesta de las plantas frente al déficit hídrico podría echar luz a los mecanismos que subyacen a la inducción del estrés y las respuestas adaptativas de las plantas de soja.

En este trabajo se identificó un gen de soja (*GmDIAT*) que podría participar en el metabolismo de BCAAs durante el estrés hídrico y osmótico. Se observó que *GmDIAT* se induce en plantas de soja en condiciones de déficit hídrico, y que su expresión en un sistema heterólogo podría estar vinculada a una mayor acumulación de BCAAs. A su vez, la sobre-expresión de *GmDIAT* en *Arabidopsis* promueve la germinación y crecimiento de las plantas en condiciones de estrés osmótico por NaCl y manitol, y aumenta el rendimiento de las plantas expuestas a condiciones de déficit hídrico respecto a plantas WT.

En este contexto, sería interesante estudiar el perfil de expresión espacio-temporal del gen *GmDIAT.* Para ello se podrían generar plantas de *Arabidopsis* conteniendo un gen reportero, como por ejemplo el gen codificante para la enzima glucuronidasa, bajo la regulación del promotor de *GmDIAT.* Esto permitiría evidenciar la expresión del gen durante el desarrollo de las plantas, así como en plantas expuestas a diferentes condiciones de estrés. Además, dado que el promotor de *GmDIAT* presenta varios elementos de unión a TFs regulados por ABA, se podría evaluar la expresión del transgén agregando ABA en forma exógena, para determinar si la expresión de *GmDIAT* es ABA dependiente.

En este trabajo se han propuesto diversos mecanismos mediante los cuales podrían actuar los BCAAs en condiciones de déficit hídrico, como la inducción de las respuestas mediadas por ABA a través de la vía de JA-Ile, la regulación del sistema TOR, el reciclado del poder reductor en cloroplastos, así como la participación como catabolitos y dadores de electrones para la cadena respiratoria (Fig. 29).

Dado que la activación de la señalización por ABA lleva a la inducción de enzimas con actividad antioxidante (Ahmad *et al.*, 2010; Hadiarto & Tran, 2011; Umezawa *et al.,* 2006), y que el reciclado de poder reductor en el cloroplasto lleva a una disminución en la generación de especies reactivas del oxígeno (Ingrisano *et al.,* 2023), la acumulación de BCAAs podría participar en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno. En este trabajo se exploró el efecto de GmDIAT sobre la acumulación de ROS en plantas transgénicas y no se observaron diferencias significativas con respecto al genotipo WT. Sin embargo, sí se observaron cambios en la expresión de TOR entre las plantas de *Arabidopsis* con sobre-expresión de GmDIAT y las plantas WT, lo cual sugiere que la vía de TOR podría explicar, al menos parcialmente, el mejor desempeño de las plantas transgénicas con respeto a las WT en condiciones de estrés.

La síntesis *de novo* mediada por enzimas BCATs citosólicas es controversial, ya que las enzimas descritas hasta el momento en especies como *Arabidopsis* y tomate parecerían haber perdido su capacidad catalítica en el metabolismo de BCAAs, siendo implicados principalmente en el metabolismo de glucosinolatos derivados de Met. Dado que GmDIAT y OsDIAT se encuentran separadas filogenéticamente de las BCATs reportadas, resulta interesante estudiar este grupo de aminotransferasas para echar luz acerca de su origen evolutivo y sobre las funciones que podrían estar llevando a cabo en el metabolismo celular y en las respuestas de la plantas frente al estrés. En este sentido, resulta evidente la necesidad de caracterizar las propiedades enzimáticas de GmDIAT para dilucidar su afinidad por diferentes sustratos, entre ellos los BCAAs y sus correspondientes oxoácidos, así como Met y sus derivados. Dado que GmDIAT se asigna a la vía de folato también sería interesante probar su capacidad de síntesis de pABA *in vitro*. Además, se podría cuantificar la acumulación de los diversos compuestos de interés en plantas WT así como plantas sobre-expresantes de GmDIAT mediante HPLC, para dilucidar si la expresión de GmDIAT se correlaciona con la acumulación de glucosinolatos y folatos *in planta*.

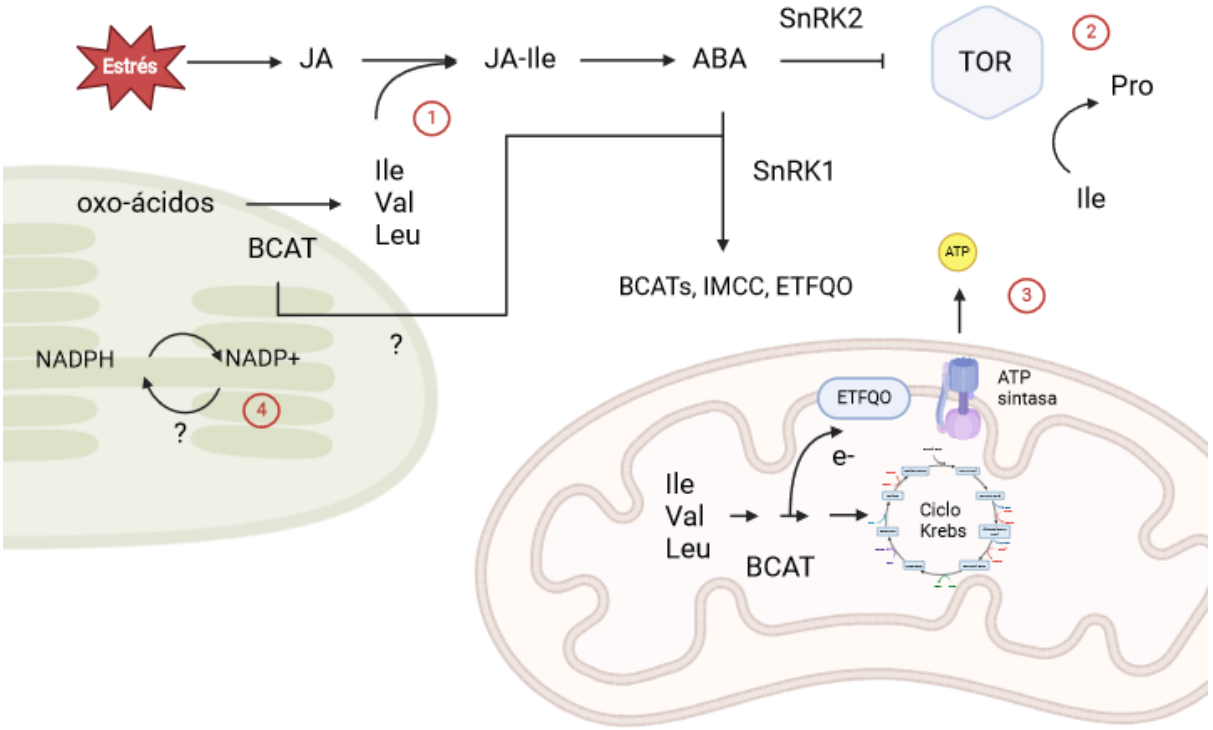


Figura 29. Modelo propuesto sobre el rol de los BCAAs en condiciones de estrés por déficit hídrico. 1. Síntesis de JA-Ile e inducción de la señalización por ABA. **2.** Señalización mediada por el sistema TOR e inhibición de la retroalimentación negativa de la prolina (Pro) mediada por leucina (Leu). **3.** Catabolismo de BCAAs y generación de energía en forma de ATP en las mitocondrias. **4.** Regulación del balance $NADP^+$/NADPH en cloroplastos mediada por la síntesis de BCAAs. Imagen creada con BioRender.com.

En condiciones de déficit hídrico se activan mecanismos de autofagia para la removilización de nutrientes, lo cual implica la degradación de proteínas. En este contexto, algunos autores proponen que el aumento de aminoácidos en condiciones de estrés se debe principalmente a la proteólisis y no a la síntesis *de novo* (Hildebrandt, 2018; Hirota *et al.,* 2018; Huang *et al.,* 2017). En este sentido, sería interesante cuantificar la acumulación de BCAAs en plantas mutantes con pérdida de función para distintos genes de la vía de síntesis de BCAAs, incluidas enzimas BCATs, para evaluar su efecto en la acumulación de BCAAs en condiciones de estrés hídrico, así como utilizar inhibidores del proteasoma y/o de la inducción de los procesos de autofagia y senescencia inducidos por estrés.

En conjunto, los resultados de este trabajo contribuyen al entendimiento del metabolismo de BCAAs en soja, así como del posible rol de GmDIAT en el metabolismo de BCAAs y en la tolerancia al déficit hídrico. Además, la generación de plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen *GmDIAT* constituyen una herramienta fundamental para continuar estudiando el rol de GmDIAT en el metabolismo de las plantas, con el potencial de desarrollar cultivos más tolerantes al déficit hídrico en soja y otras especies vegetales.

Bibliografía

Abhilasha, A., & Roy Choudhury, S. (2021). Molecular and Physiological Perspectives of Abscisic Acid Mediated Drought Adjustment Strategies. *Plants (Basel, Switzerland)*, *10*(12), 2769. https://doi.org/10.3390/plants10122769

Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., & Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical reviews in biotechnology*, *30*(3), 161–175. https://doi.org/10.3109/07388550903524243

Ahmed, S., Kouser, S., Asgher, M., & Gandhi, S. G. (2021). Plant aquaporins: A frontward to make crop plants drought resistant. *Physiologia plantarum*, *172*(2), 1089–1105. https://doi.org/10.1111/ppl.13416

Alabadí, D., Blázquez, M. A., Carbonell, J., Ferrándiz, C., & Pérez-Amador, M. A. (2009). Instructive roles for hormones in plant development. *The International journal of developmental biology*, *53*(8-10), 1597–1608. https://doi.org/10.1387/ijdb.072423da

Alia, Saradhi, P. P., & Mohanty, P. (1997). Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B Biology*, *38*(2-3), 253-257. https://doi.org/10.1016/s1011-1344(96)07470-2

Almagro Armenteros, J. J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Elofsson, A., & Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life science alliance*, *2*(5), e201900429. https://doi.org/10.26508/lsa.201900429

Alsamadany, H., Mansour, H., Elkelish, A., & Ibrahim, M. F. M. (2022). Folic Acid Confers Tolerance against Salt Stress-Induced Oxidative Damages in Snap Beans through Regulation Growth, Metabolites, Antioxidant Machinery and Gene Expression. *Plants (Basel, Switzerland),* 11(11), 1459. https://doi.org/10.3390/plants11111459

Anderson, M. D., Che, P., Song, J., Nikolau, B. J., & Wurtele, E. S. (1998). 3-Methylcrotonyl-coenzyme

A carboxylase is a component of the mitochondrial leucine catabolic pathway in plants. *Plant physiology*, *118*(4), 1127–1138. https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1127

Angelovici, R., Lipka, A. E., Deason, N., Gonzalez-Jorge, S., Lin, H., Cepela, J., Buell, R., Gore, M. A., & Dellapenna, D. (2013). Genome-wide analysis of branched-chain amino acid levels in Arabidopsis seeds. *The Plant cell*, *25*(12), 4827–4843. https://doi.org/10.1105/tpc.113.119370

Anjum, S. A., Wang, L., Farooq, M., Khan, I., & Xue, L. (2011). Methyl Jasmonate-Induced Alteration in Lipid Peroxidation, Antioxidative Defence System and Yield in Soybean Under Drought. *Journal Of Agronomy And Crop Science*, *197*(4), 296-301. https://doi.org/10.1111/j.1439-037x.2011.00468.x

Araújo, W. L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J., & Fernie, A. R. (2011). Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in plant science*, *16*(9), 489–498. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.05.008

Arbona, V., Argamasilla, R., & Gómez-Cadenas, A. (2010). Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of Arabidopsis thaliana and Thellungiella halophila to water and salt stress. *Journal of plant physiology*, *167*(16), 1342–1350. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.05.012

Bandurska, H, Hayat, A., Ahmad, A., Alyemeni, M.N., Eds.(2013). Salicylic acid: An update on biosynthesis and action in plant response to water deficit and performance under drought. *In Salicylic Acid Plant Growth and Development. Springer,* 1–14.

Bedhomme, M., Hoffmann, M., McCarthy, E. A., Gambonnet, B., Moran, R. G., Rébeillé, F., & Ravanel, S. (2005). Folate metabolism in plants: an Arabidopsis homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts. *The Journal of biological chemistry*, *280*(41), 34823–34831. https://doi.org/10.1074/jbc.M506045200

Belda-Palazón, B., Adamo, M., Valerio, C., Ferreira, L. J., Confraria, A., Reis-Barata, D., Rodrigues, A., Meyer, C., Rodriguez, P. L., & Baena-González, E. (2020). A dual function of SnRK2 kinases in the regulation of SnRK1 and plant growth. *Nature plants*, *6*(11), 1345–1353. https://doi.org/10.1038/s41477-020-00778-w

Binder, S. (2010). Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Arabidopsis thaliana. *The arabidopsis book*, *8*, e0137. https://doi.org/10.1199/tab.0137

Boggess, S. F., & Koeppe, D. E. (1978). Oxidation of proline by plant mitochondria. *Plant physiology*, *62*(1), 22–25. https://doi.org/10.1104/pp.62.1.22

Bowne, J. B., Erwin, T. A., Juttner, J., Schnurbusch, T., Langridge, P., Bacic, A., & Roessner, U. (2012). Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Molecular plant*, *5*(2), 418–429. https://doi.org/10.1093/mp/ssr114

Brookbank, B. P., Patel, J., Gazzarrini, S., & Nambara, E. (2021). Role of Basal ABA in Plant Growth and Development. *Genes*, *12*(12), 1936. https://doi.org/10.3390/genes12121936

Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Coomassie blue staining. *Methods in enzymology*, *541*, 161–167. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6.

Buffagni, V., Vurro, F., Janni, M., Gullì, M., Keller, A. A., & Marmiroli, N. (2020). Shaping Durum Wheat for the Future: Gene Expression Analyses and Metabolites Profiling Support the Contribution of BCAT Genes to Drought Stress Response. *Frontiers in plant science*, *11*, 891. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00891

Caldana, C., Li, Y., Leisse, A., Zhang, Y., Bartholomaeus, L., Fernie, A. R., Willmitzer, L., & Giavalisco, P. (2013). Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *73*(6), 897–909. https://doi.org/10.1111/tpj.12080

Cao, P., Kim, S. J., Xing, A., Schenck, C. A., Liu, L., Jiang, N., Wang, J., Last, R. L., & Brandizzi, F. (2019). Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the activity of TOR signaling in *Arabidopsis*. *eLife*, *8*, e50747. https://doi.org/10.7554/eLife.50747

Castro, P., Puertolas, J., & Dodd, I. C. (2018). Stem girdling uncouples soybean stomatal conductance from leaf water potential by enhancing leaf xylem ABA concentration. *Environmental And Experimental Botany*, *159*, 149-156. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.020

Chaudhry, S., & Sidhu, G. P. S. (2022). Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: a comprehensive review. *Plant cell reports*, *41*(1), 1–31. https://doi.org/10.1007/s00299-021-02759-5

Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals Of Botany*, *103*(4), 551-560. https://doi.org/10.1093/aob/mcn125

Chen, G. H., Liu, M. J., Xiong, Y., Sheen, J., & Wu, S. H. (2018). TOR and RPS6 transmit light signals to enhance protein translation in deetiolating *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(50), 12823–12828. https://doi.org/10.1073/pnas.1809526115

Chen, H., Saksa, K., Zhao, F., Qiu, J., & Xiong, L. (2010). Genetic analysis of pathway regulation for enhancing branched-chain amino acid biosynthesis in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *63*(4), 573–583. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04261.x

Chevilly, S., Dolz-Edo, L., Martínez-Sánchez, G., Morcillo, L., Vilagrosa, A., López-Nicolás, J. M., Blanca, J., Yenush, L., & Mulet, J. M. (2021). Distinctive Traits for Drought and Salt Stress Tolerance in Melon (*Cucumis melo* L.). *Frontiers in plant science*, *12*, 777060. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.777060

Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., & Kim, S. Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of biological chemistry*, *275*(3), 1723–1730. https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1723

Chow, C. N., Yang, C. W., Wu, N. Y., Wang, H. T., Tseng, K. C., Chiu, Y. H., Lee, T. Y., & Chang, W. C. (2024). PlantPAN 4.0: updated database for identifying conserved non-coding sequences and exploring dynamic transcriptional regulation in plant promoters. *Nucleic acids research*, *52*(D1), D1569–D1578. https://doi.org/10.1093/nar/gkad945

Ciura, J., & Kruk, J. (2018). Phytohormones as targets for improving plant productivity and stress tolerance. *Journal of plant physiology*, *229*, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.06.013

Claeys, H., & Inzé, D. (2013). The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant physiology*, *162*(4), 1768–1779. https://doi.org/10.1104/pp.113.220921

Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant journal: for cell and molecular biology,* 16(6), 735–743. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x

Conway, M. E. (2021). Emerging moonlighting functions of the branched chain aminotransferase proteins. *Antioxidants & Redox Signaling, 34*(13), 1048–1067.

Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). BIOSYNTHESIS AND ACTION OF JASMONATES IN PLANTS. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, *48*, 355–381. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.355

Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, *3*(3), 156–165. https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536

Curien, G., Biou, V., Mas-Droux, C., Robert-Genthon, M., Ferrer, J. L., & Dumas, R. (2008). Amino acid biosynthesis: new architectures in allosteric enzymes. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, *46*(3), 325–339. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.006

Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., & Wu, G. (2014). Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, *964*, 116–127. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.025

Dar, N. A., Amin, I., Wani, W., Wani, S. A., Shikari, A. B., Wani, S. H., & Masoodi, K. Z. (2017). Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants. *Plant Gene*, *11*, 106-111. https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.003

Daszkowska-Golec, A. (2016). The Role of Abscisic Acid in Drought Stress: How ABA Helps Plants to Cope with Drought Stress. En *Springer eBooks* (pp. 123-151). https://doi.org/10.1007/978-3-319-32423-4_5

Dejonghe, W., Okamoto, M., & Cutler, S. R. (2018). Small Molecule Probes of ABA Biosynthesis and Signaling. *Plant & cell physiology*, *59*(8), 1490–1499. https://doi.org/10.1093/pcp/pcy126

De Ollas, C., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2015). Jasmonoyl isoleucine accumulation is needed for abscisic acid build-up in roots of Arabidopsis under water stress conditions. *Plant, cell & environment*, *38*(10), 2157–2170. https://doi.org/10.1111/pce.12536

De Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia plantarum*, *147*(3), 296–306. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01659.x

Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Däschner, K., Binder, S., & Frommer, W. B. (2001). A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *27*(4), 345–356. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01101.x

Diebold, R., Schuster, J., Däschner, K., & Binder, S. (2002). The branched-chain amino acid transaminase gene family in Arabidopsis encodes plastid and mitochondrial proteins. *Plant physiology*, *129*(2), 540–550. https://doi.org/10.1104/pp.001602

Dinakar, C., Djilianov, D., & Bartels, D. (2012). Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, *182*, 29–41. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.018

Do, T.T., SOEISHI2, K., YUASA, T. (2022). Induction of Branched-Chain amino acid aminotransferase genes (GMBCATs) and ATG8 homolog genes in response to drought stress in soybean [Glycine Max (L.) Merr.]. *Cryobiology And Cryotechnology*, *68*(1, 17).

Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., & Meyer, C. (2016). TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annual review of plant biology*, *67*, 261–285. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114648

Ellerström, M., Josefsson, L. G., Rask, L., & Ronne, H. (1992). Cloning of a cDNA for rape chloroplast 3-isopropylmalate dehydrogenase by genetic complementation in yeast. *Plant molecular biology*, *18*(3), 557–566. https://doi.org/10.1007/BF00040671

Fàbregas, N., & Fernie, A. R. (2019). The metabolic response to drought. *Journal of experimental botany*, *70*(4), 1077–1085. https://doi.org/10.1093/jxb/ery437

FAO 2021. World Food and Agriculture- Statistical Yearbook 2021. Rome. https://doi.org/10.4060/cb4477en

Fleitas, A. L., Castro, A., Blumwald, E., & Vidal, S. (2023). Functional specialization of chloroplast vesiculation (*CV*) duplicated genes from soybean shows partial overlapping roles during stress-induced or natural senescence. *Frontiers in plant science*, *14*, 1184020. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1184020.

Frimpong, F., Anokye, M., Windt, C. W., Naz, A. A., Frei, M., Dusschoten, D. V., & Fiorani, F. (2021). Proline-Mediated Drought Tolerance in the Barley (Hordeum vulgare L.) Isogenic Line Is Associated with Lateral Root Growth at the Early Seedling Stage. Plants (Basel, Switzerland), 10(10), 2177. https://doi.org/10.3390/plants10102177

Fujiki, Y., Ito, M., Itoh, T., Nishida, I., & Watanabe, A. (2002). Activation of the promoters of Arabidopsis genes for the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in transgenic tobacco BY-2 cells under sugar starvation. Plant & cell physiology, 43(3), 275–280. https://doi.org/10.1093/pcp/pcf032

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant cell*, *17*(12), 3470–3488. https://doi.org/10.1105/tpc.105.035659

Galili, G., Amir, R., & Fernie, A. R. (2016). The Regulation of Essential Amino Acid Synthesis and Accumulation in Plants. *Annual review of plant biology*, *67*, 153–178. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112213

Gilroy, S., Read, N. D., & Trewavas, A. J. (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature*, *346*(6286), 769–771. https://doi.org/10.1038/346769a0

Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, *40*(Database issue), D1178–D1186. https://doi.org/10.1093/nar/gkr944

Gorelova, V., Ambach, L., Rébeillé, F., Stove, C., & Van Der Straeten, D. (2017). Folates in Plants: Research Advances and Progress in Crop Biofortification. *Frontiers In Chemistry*, *5*. https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00021

Graham, I. A., & Eastmond, P. J. (2002). Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Progress in lipid research*, *41*(2), 156–181. https://doi.org/10.1016/s0163-7827(01)00022-4

Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. The Plant Journal, 64(2), 355-365. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04322.x

Guo, Y. Y., Yu, H. Y., Kong, D. S., Yan, F., & Zhang, Y. J. (2016). Effects of drought stress on growth and chlorophyll fluorescence of Lycium ruthenicum Murr. seedlings. *Photosynthetica*, *54*(4), 524-531. https://doi.org/10.1007/s11099-016-0206-x

Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science (New York, N.Y.)*, *368*(6488), 266–269. https://doi.org/10.1126/science.aaz7614

Gupta, K., Wani, S. H., Razzaq, A., Skalicky, M., Samantara, K., Gupta, S., Pandita, D., Goel, S., Grewal, S., Hejnak, V., Shiv, A., El-Sabrout, A. M., Elansary, H. O., Alaklabi, A., & Brestic, M. (2022). Abscisic Acid: Role in Fruit Development and Ripening. *Frontiers in plant science*, *13*, 817500. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.817500

Halgand, F., Wessel, P. M., Laprévote, O., & Dumas, R. (2002). Biochemical and mass spectrometric evidence for quaternary structure modifications of plant threonine deaminase induced by isoleucine. *Biochemistry*, *41*(46), 13767–13773. https://doi.org/10.1021/bi0262348

Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual review of plant biology*, *57*, 303–333. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228

Hare, P., & Cress, W. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, *21*(2), 79-102. https://doi.org/10.1023/a:1005703923347

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant signaling & behavior*, *7*(11), 1456–1466. https://doi.org/10.4161/psb.21949

Heinemann, B., Künzler, P., Eubel, H., Braun, H. P., & Hildebrandt, T. M. (2021). Estimating the number of protein molecules in a plant cell: protein and amino acid homeostasis during drought. *Plant physiology*, *185*(2), 385–404. https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa050

Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araújo, W. L., & Braun, H. P. (2015). Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular plant*, *8*(11), 1563–1579. https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005

Hildebrandt T. M. (2018). Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during Arabidopsis abiotic stress response. *Plant molecular biology*, *98*(1-2), 121–135. https://doi.org/10.1007/s11103-018-0767-0

Hirota, T., Izumi, M., Wada, S., Makino, A., & Ishida, H. (2018). Vacuolar Protein Degradation via Autophagy Provides Substrates to Amino Acid Catabolic Pathways as an Adaptive Response to

Sugar Starvation in Arabidopsis thaliana. *Plant & cell physiology*, *59*(7), 1363–1376. https://doi.org/10.1093/pcp/pcy005

Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, *35*(Web Server issue), W585–W587. https://doi.org/10.1093/nar/gkm259

Huang, T., & Jander, G. (2017). Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in Arabidopsis thaliana. *Planta*, *246*(4), 737–747. https://doi.org/10.1007/s00425-017-2727-3

Huang, X., Zheng, C., Liu, F., Yang, C., Zheng, P., Lu, X., Tian, J., Chung, T., Otegui, M. S., Xiao, S., Gao, C., Vierstra, R. D., & Li, F. (2019). Genetic Analyses of the Arabidopsis ATG1 Kinase Complex Reveal Both Kinase-Dependent and Independent Autophagic Routes during Fixed-Carbon Starvation. *The Plant cell*, *31*(12), 2973–2995. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00066

Huang, Y., Zhou, J., Li, Y., Quan, R., Wang, J., Huang, R., & Qin, H. (2021). Salt Stress Promotes Abscisic Acid Accumulation to Affect Cell Proliferation and Expansion of Primary Roots in Rice. *International journal of molecular sciences*, *22*(19), 10892. https://doi.org/10.3390/ijms221910892

Huang, Y. C., Niu, C. Y., Yang, C. R., & Jinn, T. L. (2016). The Heat Stress Factor HSFA6b Connects ABA Signaling and ABA-Mediated Heat Responses. *Plant physiology*, *172*(2), 1182–1199. https://doi.org/10.1104/pp.16.00860

Hussain, S. S., Ali, M., Ahmad, M., & Siddique, K. H. (2011). Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology advances*, *29*(3), 300–311. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.003

Ibrahim, M. F. M., Ibrahim, H. A., & Abd El-Gawad, H. G. (2020). Folic acid as a protective agent in snap bean plants under water deficit conditions. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *96*(1), 94–109. https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1793691

Ingrisano, R., Tosato, E., Trost, P., Gurrieri, L., & Sparla, F. (2023). Proline, Cysteine and Branched-Chain Amino Acids in Abiotic Stress Response of Land Plants and Microalgae. *Plants (Basel, Switzerland)*, *12*(19), 3410. https://doi.org/10.3390/plants12193410

INIA, 2012. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay. Revista - Nº 30. http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/4842/1/revista-INIA-30.pdf

Ishizaki, K., Larson, T. R., Schauer, N., Fernie, A. R., Graham, I. A., & Leaver, C. J. (2005). The critical role of Arabidopsis electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation. *The Plant cell*, *17*(9), 2587–2600. https://doi.org/10.1105/tpc.105.035162

Ishizaki, K., Schauer, N., Larson, T. R., Graham, I. A., Fernie, A. R., & Leaver, C. J. (2006). The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of Arabidopsis in extended darkness. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *47*(5), 751–760. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02826.x

Islam, M. A., Du, H., Ning, J., Ye, H., & Xiong, L. (2009). Characterization of Glossy1-homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance. *Plant molecular biology*, *70*(4), 443–456. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9483-0

Joshi, V., Joung, J. G., Fei, Z., & Jander, G. (2010). Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino acids*, *39*(4), 933–947. https://doi.org/10.1007/s00726-010-0505-7

Kapilan, R., Vaziri, M., & Zwiazek, J. J. (2018). Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research*, *51*(1). https://doi.org/10.1186/s40659-018-0152-0

Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in plant science*, *7*(5), 193–195. https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02251-3

Kavi Kishor, P.B. et al. (2005).Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* 88, 424– 438

Khan, M. T., Ahmed, S., Sardar, R., Shareef, M., Abbasi, A., Mohiuddin, M., Ercisli, S., Fiaz, S., Marc, R. A., Attia, K., Khan, N., & Golokhvast, K. S. (2022). Impression of foliar-applied folic acid on coriander (*Coriandrum sativum* L.) to regulate aerial growth, biochemical activity, and essential oil profiling under drought stress. *Frontiers in plant science*, *13*, 1005710. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1005710

Khedr, A. H., Abbas, M. A., Wahid, A. A., Quick, W. P., & Abogadallah, G. M. (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of Pancratium maritimum L. to salt-stress. *Journal of experimental botany*, *54*(392), 2553–2562. https://doi.org/10.1093/jxb/erg277

Kim, E. H., Kim, Y. S., Park, S. H., Koo, Y. J., Choi, Y. D., Chung, Y. Y., Lee, I. J., & Kim, J. K. (2009). Methyl jasmonate reduces grain yield by mediating stress signals to alter spikelet development in rice. *Plant physiology*, *149*(4), 1751–1760. https://doi.org/10.1104/pp.108.134684

Kim, J., & Guan, K. L. (2019). mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nature cell biology*, *21*(1), 63–71. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0205-1

Kim, T. H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO2, and Ca2+ signaling. *Annual review of plant biology*, *61*, 561–591. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112226

Knill, T., Schuster, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Binder, S. (2008). Arabidopsis branched-chain aminotransferase 3 functions in both amino acid and glucosinolate biosynthesis. *Plant physiology*, *146*(3), 1028–1039. https://doi.org/10.1104/pp.107.111609

Koo, A. J., & Howe, G. A. (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, *70*(13-14), 1571–1580. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.018

Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, *63*(4), 1593–1608. https://doi.org/10.1093/jxb/err460

Kroumova, A. B., & Wagner, G. J. (2003). Different elongation pathways in the biosynthesis of acyl groups of trichome exudate sugar esters from various solanaceous plants. *Planta*, *216*(6), 1013–1021. https://doi.org/10.1007/s00425-002-0954-7

Kumar, M., Kumar Patel, M., Kumar, N., Bajpai, A. B., & Siddique, K. H. M. (2021). Metabolomics and Molecular Approaches Reveal Drought Stress Tolerance in Plants. *International journal of molecular sciences*, *22*(17), 9108. https://doi.org/10.3390/ijms22179108

Kumar, R., Khurana, A., & Sharma, A. K. (2014). Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. Journal of experimental botany, 65(16), 4561–4575. https://doi.org/10.1093/jxb/eru277

Kunert, K., & Vorster, B. J. (2020). In search for drought-tolerant soybean: is the slow-wilting phenotype more than just a curiosity?. *Journal of experimental botany*, *71*(2), 457–460. https://doi.org/10.1093/jxb/erz235

Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., Bloom, R. E., Bodde, S., Jones, J. D., & Schroeder, J. I. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO journal*, *22*(11), 2623–2633. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg277

Lächler, K., Imhof, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Binder, S. (2015). The cytosolic branched-chain aminotransferases of Arabidopsis thaliana influence methionine supply, salvage and glucosinolate metabolism. *Plant molecular biology*, *88*(1-2), 119–131. https://doi.org/10.1007/s11103-015-0312-3

Lee, Z. H., Hirakawa, T., Yamaguchi, N., & Ito, T. (2019). The Roles of Plant Hormones and Their Interactions with Regulatory Genes in Determining Meristem Activity. *International journal of molecular sciences*, *20*(16), 4065. https://doi.org/10.3390/ijms20164065

Leth, I. K., & McDonald, K. A. (2017). Media development for large scale Agrobacterium tumefaciens culture. *Biotechnology Progress*, 33(5), 1218-1225. doi:10.1002/btpr.2504.

Li, S., Peng, F., Xiao, Y., Gong, Q., Bao, Z., Li, Y., & Wu, X. (2020). Mechanisms of High Concentration Valine-Mediated Inhibition of Peach Tree Shoot Growth. *Frontiers in plant science*, *11*, 603067. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.603067

Li, X., Cai, W., Liu, Y., Li, H., Fu, L., Liu, Z., Xu, L., Liu, H., Xu, T., & Xiong, Y. (2017). Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(10), 2765–2770. https://doi.org/10.1073/pnas.1618782114

Liu, S., Zhang, M., Feng, F., & Tian, Z. (2020). Toward a "Green Revolution" for Soybean. *Molecular plant*, *13*(5), 688–697. https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.03.002

Lucena, M., Romero-Aranda, R., Mercado, J.,Cuartero, J., Valpuesta, V., Quesada, M. (2003). Structural and physiological changes in the roots of tomato plants over-expressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum,* 18:422–429.

Luo L. J. (2010). Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. *Journal of experimental botany*, *61*(13), 3509–3517. https://doi.org/10.1093/jxb/erq185

Magnusson, B. (2014). The fitness for purpose of analytical methods : A laboratory guide to method validation and related topics (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0.

Mahmood, T., Khalid, S., Abdullah, M., Ahmed, Z., Shah, M. K. N., Ghafoor, A., & Du, X. (2019). Insights into Drought Stress Signaling in Plants and the Molecular Genetic Basis of Cotton Drought Tolerance. *Cells*, *9*(1), 105. https://doi.org/10.3390/cells9010105

Malatrasi, M., Corradi, M., Svensson, J. T., Close, T. J., Gulli, M., & Marmiroli, N. (2006). A branched-chain amino acid aminotransferase gene isolated from Hordeum vulgare is differentially regulated by drought stress. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, *113*(6), 965–976. https://doi.org/10.1007/s00122-006-0339-6

Malinovsky, F. G., Thomsen, M. F., Nintemann, S. J., Jagd, L. M., Bourgine, B., Burow, M., & Kliebenstein, D. J. (2017). An evolutionarily young defense metabolite influences the root growth of plants via the ancient TOR signaling pathway. *eLife*, *6*, e29353. https://doi.org/10.7554/eLife.29353

Maloney, G. S., Kochevenko, A., Tieman, D. M., Tohge, T., Krieger, U., Zamir, D., Taylor, M. G., Fernie, A. R., & Klee, H. J. (2010). Characterization of the branched-chain amino acid aminotransferase enzyme family in tomato. *Plant physiology*, *153*(3), 925–936. https://doi.org/10.1104/pp.110.154922

Manavalan, L. P., Guttikonda, S. K., Tran, L. S., & Nguyen, H. T. (2009). Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant & cell physiology*, *50*(7), 1260–1276. https://doi.org/10.1093/pcp/pcp082

Margets, A., Foster, J., Kumar, A., Maier, T. R., Masonbrink, R., Mejias, J., Baum, T. J., & Innes, R. W. (2024). The Soybean Cyst Nematode Effector Cysteine Protease 1 (CPR1) Targets a Mitochondrial Soybean Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase (GmBCAT1). *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 10.1094/MPMI-06-24-0068-R. Advance online publication. https://doi.org/10.1094/MPMI-06-24-0068-R

Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T. A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., Satou, M., Kim, J. M., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K., & Seki, M. (2008). Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant & cell physiology*, *49*(8), 1135–1149. https://doi.org/10.1093/pcp/pcn101

MGAP, 2022. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay. Encuesta Agrícola “Invierno 2022”.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/comunicado_prensa_inv_2023.pdf

Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Curr Sci (Bangalore)*, 80, 758–763.

Muhammad Aslam, M., Waseem, M., Jakada, B. H., Okal, E. J., Lei, Z., Saqib, H. S. A., Yuan, W., Xu, W., & Zhang, Q. (2022). Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *International journal of molecular sciences*, *23*(3), 1084. https://doi.org/10.3390/ijms23031084

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Nadarajah, K. K. (2020). ROS Homeostasis in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International journal of molecular sciences*, *21*(15), 5208. https://doi.org/10.3390/ijms21155208

O'Leary, B. M., Oh, G. G. K., Lee, C. P., & Millar, A. H. (2020). Metabolite Regulatory Interactions Control Plant Respiratory Metabolism via Target of Rapamycin (TOR) Kinase Activation. *The Plant cell*, *32*(3), 666–682. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00157

Oh, S.A., Lee, S.Y., Chung, I.K., Lee, C.H. & Nam, H.G. (1996) A senescence associated gene of Arabidopsis thaliana is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molecular Biology* 30, 739–754.

O'Leary, B. M., Oh, G. G. K., Lee, C. P., & Millar, A. H. (2019). Metabolite Regulatory Interactions Control Plant Respiratory Metabolism via Target of Rapamycin (TOR) Kinase Activation. *The Plant Cell*, *32*(3), 666-682. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00157

Park, H. Y., Seok, H. Y., Park, B. K., Kim, S. H., Goh, C. H., Lee, B. H., Lee, C. H., & Moon, Y. H. (2008). Overexpression of Arabidopsis ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochemical and biophysical research communications*, *375*(1), 80–85. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.128

Pedrotti, L., Weiste, C., Nägele, T., Wolf, E., Lorenzin, F., Dietrich, K., Mair, A., Weckwerth, W., Teige, M., Baena-González, E., & Dröge-Laser, W. (2018). Snf1-RELATED KINASE1-Controlled C/S_1-bZIP Signaling Activates Alternative Mitochondrial Metabolic Pathways to Ensure Plant Survival in Extended Darkness. *The Plant cell*, *30*(2), 495–509. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00414

Peng, C., Uygun, S., Shiu, S. H., & Last, R. L. (2015). The Impact of the Branched-Chain Ketoacid Dehydrogenase Complex on Amino Acid Homeostasis in Arabidopsis. *Plant physiology*, *169*(3), 1807–1820. https://doi.org/10.1104/pp.15.00461

Pfeiffer, A., Janocha, D., Dong, Y., Medzihradszky, A., Schöne, S., Daum, G., Suzaki, T., Forner, J., Langenecker, T., Rempel, E., Schmid, M., Wirtz, M., Hell, R., & Lohmann, J. U. (2016). Integration of light and metabolic signals for stem cell activation at the shoot apical meristem. *eLife*, *5*, e17023. https://doi.org/10.7554/eLife.17023

Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, *28*, 489–521. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055

Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J., & Jansen, M. A. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. *Trends in plant science*, *12*(3), 98–105. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.004

Pratelli, R., & Pilot, G. (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of experimental botany*, *65*(19), 5535–5556. https://doi.org/10.1093/jxb/eru320

Qin, X., & Zeevaart, J. A. (2002). Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in Nicotiana plumbaginifolia increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant physiology*, *128*(2), 544–551. https://doi.org/10.1104/pp.010663

Quinlivan, E. P., Roje, S., Basset, G., Shachar-Hill, Y., Gregory, J. F., 3rd, & Hanson, A. D. (2003). The folate precursor p-aminobenzoate is reversibly converted to its glucose ester in the plant cytosol. *The Journal of biological chemistry*, *278*(23), 20731–20737. https://doi.org/10.1074/jbc.M302894200

Rajasheker, G., Jawahar, G., Jalaja, N., Kumar, S. A., Kumari, P. H., Punita, D. L. & Kishor, P. B. K. (2019). Role and Regulation of Osmolytes and ABA Interaction in Salt and Drought Stress Tolerance. *In: Plant Signaling Molecules : Role and Regulation Under Stressful Environment. Elsevier, 417-436.*

Raya-González, J., Pelagio-Flores, R., & López-Bucio, J. (2012). The jasmonate receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and lateral root positioning in Arabidopsis thaliana. *Journal of plant physiology*, *169*(14), 1348–1358. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.002

Ren, M., Venglat, P., Qiu, S., Feng, L., Cao, Y., Wang, E., Xiang, D., Wang, J., Alexander, D., Chalivendra, S., Logan, D., Mattoo, A., Selvaraj, G., & Datla, R. (2012). Target of rapamycin signaling

regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. *The Plant cell*, *24*(12), 4850–4874. https://doi.org/10.1105/tpc.112.107144

Rosenberger, C. L., & Chen, J. (2018). To Grow or Not to Grow: TOR and SnRK2 Coordinate Growth and Stress Response in Arabidopsis. *Molecular cell*, *69*(1), 3–4. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.013

Sainz, M. M., Filippi, C. V., Eastman, G., Sotelo-Silveira, M., Zardo, S., Martínez-Moré, M., Sotelo-Silveira, J., & Borsani, O. (2024). Water deficit response in nodulated soybean roots: a comprehensive transcriptome and translatome network analysis. *BMC plant biology*, *24*(1), 585. https://doi.org/10.1186/s12870-024-05280-5

Salehin, M., Li, B., Tang, M., Katz, E., Song, L., Ecker, J. R., Kliebenstein, D. J., & Estelle, M. (2019). Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in Arabidopsis by regulating glucosinolate levels. *Nature communications*, *10*(1), 4021. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12002-1

Savouré, A., Jaoua, S., Hua, X. J., Ardiles, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (1995). Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in Arabidopsis thaliana. *FEBS letters*, *372*(1), 13–19. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00935-3

Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960–976. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004

Scarpeci, T. E., Frea, V. S., Zanor, M. I., & Valle, E. M. (2017). Overexpression of AtERF019 delays plant growth and senescence, and improves drought tolerance in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, *68*(3), 673–685. https://doi.org/10.1093/jxb/erw429

Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., & Ryabova, L. A. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *The EMBO journal*, *32*(8), 1087–1102. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61

Schepetilnikov, M., Makarian, J., Srour, O., Geldreich, A., Yang, Z., Chicher, J., Hammann, P., & Ryabova, L. A. (2017). GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *The EMBO journal*, *36*(7), 886–903. https://doi.org/10.15252/embj.201694816

Schuster, J., & Binder, S. (2005). The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology*, *57*(2), 241–254. https://doi.org/10.1007/s11103-004-7533-1

Schuster, J., Knill, T., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Binder, S. (2006). Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in Arabidopsis. *The Plant cell*, *18*(10), 2664–2679. https://doi.org/10.1105/tpc.105.039339

Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005). Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *Journal of plant physiology*, *162*(8), 854–864. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.09.011

Sharma, S., Villamor, J. G., & Verslues, P. E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant physiology*, *157*(1), 292–304. https://doi.org/10.1104/pp.111.183210

Shi, L., Wu, Y., & Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development (Cambridge, England)*, *145*(13), dev160887. https://doi.org/10.1242/dev.160887

Shim, J. S., Jeong, H. I., Bang, S. W., Jung, S. E., Kim, G., Kim, Y. S., Redillas, M. C. F. R., Oh, S. J., Seo, J. S., & Kim, J. K. (2023). DROUGHT-INDUCED BRANCHED-CHAIN AMINO ACID AMINOTRANSFERASE enhances drought tolerance in rice. *Plant physiology*, *191*(2), 1435–1447. https://doi.org/10.1093/plphys/kiac560

Signorelli, S., Tarkowski, Ł. P., Van den Ende, W., & Bassham, D. C. (2019). Linking Autophagy to Abiotic and Biotic Stress Responses. *Trends in plant science*, *24*(5), 413–430. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.001

Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., & Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in Arabidopsis. *The Plant cell*, *23*(3), 1000–1013. https://doi.org/10.1105/tpc.111.083089

Soto, A., Ruiz, K. B., Ziosi, V., Costa, G., & Torrigiani, P. (2012). Ethylene and auxin biosynthesis and signaling are impaired by methyl jasmonate leading to a transient slowing down of ripening in peach fruit. *Journal of plant physiology*, *169*(18), 1858–1865. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.07.007

Spollen, W. G., LeNoble, M. E., Samuels, T. D., Bernstein, N., & Sharp, R. E. (2000). Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant physiology*, *122*(3), 967–976. https://doi.org/10.1104/pp.122.3.967

Strizhov, N., Abrahám, E., Okrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., & Szabados, L. (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *12*(3), 557–569. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.00557.x

Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, *15*(2), 89–97. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009

Székely, G., Lichtenstein, C., & Nunes Nesi, A. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant Journal, 53*(1), 11–28.

Takahashi, F., Kuromori, T., Sato, H., Shinozaki, K. (2018). Regulatory gene networks in drought stress responses and resistance in plants In Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation. Advances in Experimental Medicine and Biology; Iwaya-Inoue, M., Sakurai, M., Uemura, M., *Eds.; Springer: Singapore;* Volume 1081

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, *28*(10), 2731–2739. https://doi.org/10.1093/molbev/msr121

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), 3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L., Li, Q. B., Cline, K., & McCarty, D. R. (2003). Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *35*(1), 44–56. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01786.x

Tardieu, F. (2013). Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Frontiers in physiology*, *4*, 17. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00017

Taylor, N. L., Heazlewood, J. L., Day, D. A., & Millar, A. H. (2004). Lipoic acid-dependent oxidative catabolism of alpha-keto acids in mitochondria provides evidence for branched-chain amino acid catabolism in Arabidopsis. *Plant physiology*, *134*(2), 838–848. https://doi.org/10.1104/pp.103.035675

Templer, S. E., Ammon, A., Pscheidt, D., Ciobotea, O., Schuy, C., McCollum, C., Sonnewald, U., Hanemann, A., Förster, J., Ordon, F., von Korff, M., & Voll, L. M. (2017). Metabolite profiling of barley flag leaves under drought and combined heat and drought stress reveals metabolic QTLs for metabolites associated with antioxidant defense. *Journal of experimental botany*, *68*(7), 1697–1713. https://doi.org/10.1093/jxb/erx038

Teng, Z., Lyu, J., Chen, Y., Zhang, J., & Ye, N. (2023). Effects of stress-induced ABA on root architecture development: Positive and negative actions. *The Crop Journal*, *11*(4), 1072-1079. https://doi.org/10.1016/j.cj.2023.06.007

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, *25*(24), 4876–4882. https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876

Trujillo, M., Kogel, K. H., & Hückelhoven, R. (2004). Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of Blumeria graminis. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 17(3), 304–312. https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.3.304

Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *57*(6), 1065–1078. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03748.x

Uruguay XXI, 2022. Informe anual de comercio exterior, Uruguay.uruguayxxi.gub.uy/es/centro-informacion/articulo/informe-anual-de-comercio-exterior-de-uruguay-2022/

USDA, 2024. U.S, Department of Agriculture, Foreign Agricultural Services. 2023/2024 soybean production. fas.usda.gov/data/production/commodity/2222000

Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y

Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M., & Sharma, S. (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in plant science*, *8*, 161. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161

Waadt, R., Seller, C. A., Hsu, P. K., Takahashi, Y., Munemasa, S., & Schroeder, J. I. (2022). Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *23*(10), 680–694. https://doi.org/10.1038/s41580-022-00479-6

Wang, P., Zhao, Y., Li, Z., Hsu, C. C., Liu, X., Fu, L., Hou, Y. J., Du, Y., Xie, S., Zhang, C., Gao, J., Cao, M., Huang, X., Zhu, Y., Tang, K., Wang, X., Tao, W. A., Xiong, Y., & Zhu, J. K. (2018). Reciprocal Regulation of the TOR Kinase and ABA Receptor Balances Plant Growth and Stress Response. *Molecular cell*, *69*(1), 100–112.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.002

Wang, X., Li, Q., Xie, J., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., & Jiang, D. (2020). Abscisic acid and jasmonic acid are involved in drought priming-induced tolerance to drought in wheat. *The Crop Journal*, *9*(1), 120-132. https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.06.002

Wang, X., Li, X., & Dong, S. (2024). Biochemical characterization and metabolic reprogramming of amino acids in Soybean roots under drought stress. *Physiologia plantarum*, *176*(3), e14319. https://doi.org/10.1111/ppl.14319

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one*, *2*(8), e718. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000718

Wolken, J. J., & Schwertz, F. A. (1953). Chlorophyll monolayers in chloroplasts. *The Journal of general physiology*, *37*(1), 111–120. https://doi.org/10.1085/jgp.37.1.111

Woo, N., Badger, M. & Pogson, B. (2008). A rapid, non-invasive procedure for quantitative assessment of drought survival using chlorophyll fluorescence. *Plant Methods* 4, 27.

Xing, A., & Last, R. L. (2017). A Regulatory Hierarchy of the Arabidopsis Branched-Chain Amino Acid Metabolic Network. *The Plant cell*, *29*(6), 1480–1499. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00186

Xiong, Y., & Sheen, J. (2012). Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *The Journal of biological chemistry*, *287*(4), 2836–2842. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.300749

Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, *496*(7444), 181–186. https://doi.org/10.1038/nature12030

Ye, N., Zhu, G., Liu, Y., Li, Y., & Zhang, J. (2011). ABA controls H_2O_2 accumulation through the induction of OsCATB in rice leaves under water stress. *Plant & cell physiology*, *52*(4), 689–698. https://doi.org/10.1093/pcp/pcr028

Yoo, S. D., Cho, Y. H., & Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols*, *2*(7), 1565–1572. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199.

Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y., & Shinozaki, K. (1995). Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *7*(5), 751–760. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1995.07050751.x

Yu, Z., Wang, X., & Zhang, L. (2018). Structural and Functional Dynamics of Dehydrins: A Plant Protector Protein under Abiotic Stress. *International journal of molecular sciences*, *19*(11), 3420. https://doi.org/10.3390/ijms19113420

Yuasa, T., Nagasawa, Y., Osanai, K., Kaneko, A., Tajima, D., Htwe, N. M. P. S., Ishibashi, Y., & Iwaya-Inoue, M. (2013). Induction of a bZIP Type Transcription Factor and Amino Acid Catabolism-Related Genes in Soybean Seedling in Response to Starvation Stress. *Journal Of Botany*, *2013*, 1-8. https://doi.org/10.1155/2013/935479

Zhang, J. Y., Broeckling, C. D., Blancaflor, E. B., Sledge, M. K., Sumner, L. W., & Wang, Z. Y. (2005). Overexpression of WXP1, a putative Medicago truncatula AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (Medicago sativa). *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *42*(5), 689–707. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02405.x

Zheng, N., Xiao, H., Zhang, Z., Gao, X., & Zhao, J. (2017). Rapid and sensitive method for determining free amino acids in plant tissue by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Acta Geochimica*, *36*(4), 680-696. https://doi.org/10.1007/s11631-017-0244-5

Zheng, Y., Cabassa-Hourton, C., Planchais, S., Lebreton, S., & Savouré, A. (2021). The proline cycle as an eukaryotic redox valve. *Journal of experimental botany*, *72*(20), 6856–6866. https://doi.org/10.1093/jxb/erab361

Zhu, M., & Assmann, S. M. (2017). Metabolic Signatures in Response to Abscisic Acid (ABA) Treatment in Brassica napus Guard Cells Revealed by Metabolomics. *Scientific reports*, *7*(1), 12875. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13166-w

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant physiology*, *136*(1), 2621–2632. https://doi.org/10.1104/pp.104.046367

Zolla, G., Heimer, Y. M., & Barak, S. (2010). Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in Arabidopsis thaliana roots. *Journal of experimental botany*, *61*(1), 211–224. https://doi.org/10.1093/jxb/erp290

Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., & van Wijk, K. J. (2008). Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PloS one*, *3*(4), e1994. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001994

Anexo

Cebadores utilizados

Tabla 4. Cebadores utilizados para la generación de las plantas transgénicas y para los ensayos de qPCR en soja y *Arabidopsis*.

Cebadores	Secuencia	Descripción
F-Gly.06G082700 (2)	CTGCACGGCTAAGAGGGTTT	Expresión de genes homólogos a *OsDIAT* en soja por qPCR
R-Gly.06G082700 (2)	TCCACTGCCAAGAAGCATCA	
F-Gly.17G190800	CCATGGAGCTTAGTTTTCAAATG	
R-Gly.17G190800	GCAGCAAGTTGTCCCTTCAT	
F-Gly.12G226400	GAAGCACGCTTCCTCTGTTG	Expresión de *GmDIAT* en soja y *Arabidopsis* transgénicas por qPCR
R-Gly.12G226400	GGCCAGCTACCATATCATCC	
Bam-OE:GmDIAAT	CTGGATCCAATATGAGGAACCCCAC	Amplificación de *GmDIAT* y genotipado de *Arabidopsis* transgénicas
Xho-OE:GmDIAAT	CTCTCGAGGTTTACTCAACATAAGG	
Not-GmDIAAT:GFP	CGAGTGCGGCCGCTCAACATAAGGAACAGG	
FwpromDIAATSR3	ACGAAAATGGGTAGCACAGAAAA	Amplificación de promotor *GmDIAT*
RvpromDIAATSR3	CAGGGGACTTGTGAGTGGG	
F-GmDIAAT_rtPCR	TCATCAGCAGGATGTCCAAC	Genotipado de *Arabidopsis* transgénicas
R-GmDIAAT_rtPCR	TCCCAAAGCATATCCGAAAG	
F-Gly.02G276600	GTTGAAAAGCCAGGGGACA	Gen de referencia para qPCR de soja (Gly02.G276600)
F-Gly.02G276600	TCTTACCCCTTGAGCGTGG	
F-AtAct2_qPCR	GTATCGCTGACCGTATGAG	Gen de referencia para qPCR de *Arabidopsis* (AT3G18780)
R-AtAct2_qPCR	CTGCTGGAATGTGCTGAG	
Fw-AtTOR:	TTACTGCCTCGCATTGCTCA	Expresión de TOR en *Arabidopsis* (AT1G50030)
Rv-AtTOR:	CGATGAACCCACTGGCTCTT	

Vectores utilizados para la generación de construcciones

El vector pENTR2B es un vector de entrada del sistema Gateway (Karimi *et al.,* 2002) que permite la clonación de secuencias de interés a través del uso de enzimas de restricción, para lo cual cuenta con un sitio de clonado múltiple. Además presenta sitios attL1 y attL2 que flanquean la secuencia de interés, y permiten la recombinación LR con un vector de destino Gateway, lo cual da lugar a la transferencia de la secuencia de interés al vector de destino en la orientación correcta para su expresión *in planta.* Contienen además el gen

ccdB, que codifica para una proteína tóxica, situado entre los dos sitios attL para la selección negativa en bacterias, así como un gen de resistencia a kanamicina para su selección en bacterias de *E. coli* (Fig. 30).

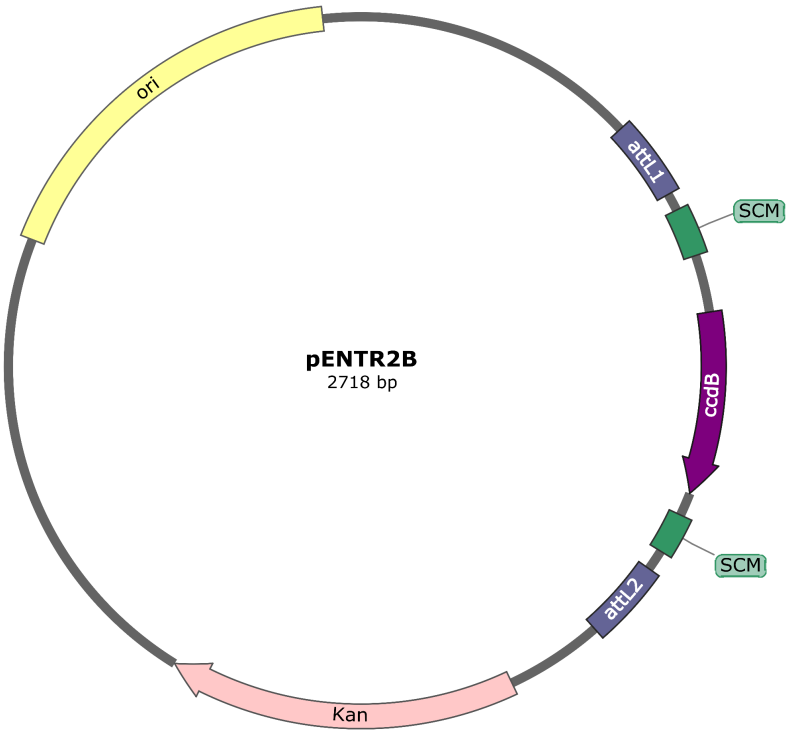


Figura 30. Vector pENTR2B. Esquema representativo del vector pENTR2B donde Kan: gen de resistencia a kanamicina; ori: sitio de replicación del vector en bacterias; SCM: sitio de clonado múltiple con sitios de corte de enzimas de restricción; attL1 y attL2: sitios de recombinación; ccdB: gen letal.

Tanto el vector pUB-DEST como el vector pK7FWG2,0 son vectores de destino binarios del sistema Gateway, que permiten la transformación de especies vegetales en forma estable, mediada por *A. tumefaciens* (Karimi *et al.,* 2002). Para ello, contienen los sitios LB (*left border*) y RB (*right border*) que flanquean la secuencia de interés a ser transferida por la maquinaria bacteriana en el genoma vegetal. A su vez, contienen un *cassette* que incluye los elementos attR1 y attR2 que permiten la recombinación LR con el vector pENTR2B para la transferencia del inserto al vector de expresión (dando lugar a los sitios attB1 y attB2 en el vector final) y el gen ccdB, que codifica para una proteína tóxica, entre los sitios attR1 y attR2, para la selección negativa en bacterias.

El vector pUB-DEST (Grefen *et al.,* 2010) contiene además, las primeras 634 pares de bases corriente arriba del promotor del gen ubiquitina-10 de Arabidopsis (At4g05320), bajo el cual queda regulado en gen de interés, y un terminador 35S (T35S) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Contiene el gen codificante a la aminoglucósido-3-adeniltransferasa (SmR) que confiere tolerancia a la estreptomicina y espectinomicina en *E. coli y A. tumefaciens*, y la secuencia codificante para la fósforofinotricina-N-acetiltransferasa (BIpR) que confiere resistencia a Basta o higromicina para la selección *in* planta (Fig. 31).

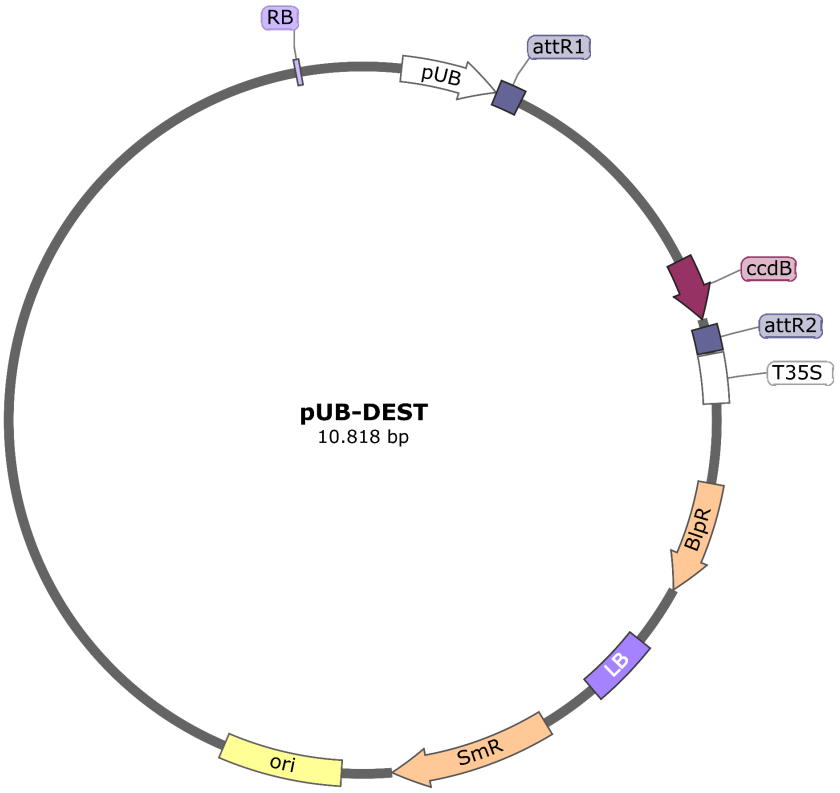


Figura 31. Vector pUB-DEST. Esquema representativo del vector pUB-DEST donde SmR: gen de resistencia a estreptomicina y espectinomicina; BlpR: gen de resistencia a Basta; ori: sitio de replicación del vector en bacterias; attR1 y attR2: sitios de recombinación; ccdB: gen letal; LB (left border) y RB (right border): sitios de transferencia mediada por *A. tumefaciens;* pUB: promotor de ubiquitina 10 de *Arabidopsis*; T35S: terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor.

Por otro lado el vector pK7FWG2,0 tiene un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), y contiene además un gen reportero *GFP:GUS*, que queda en fase con el gen de interés, y un terminador 35S (T35S) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Esto permite expresar la proteína de estudio fusionada a la proteína reportera, pudiendo observar la expresión de la proteína mediante microscopía de fluorescencia o mediante ensayos histoquímicos a través de la actividad de la □-glucuronidasa codificada por GUS. Presenta también un gen de resistencia a kanamicina que permite la selección en bacterias de *E. coli y A. tumefaciens* y su selección *in planta* (Fig. 32).

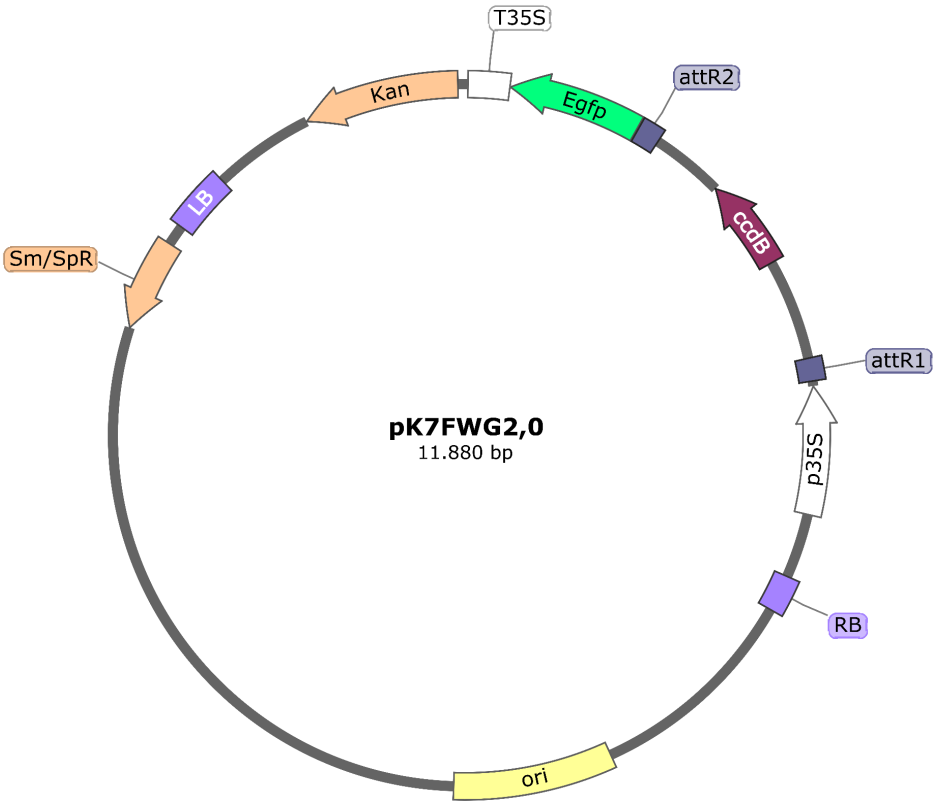


Figura 31. Vector pk7FWG2,0. Esquema representativo del vector pk7FWG2,0 donde SmR: gen de resistencia a estreptomicina y espectinomicina; Kan: gen de resistencia a kanamicina; ori: sitio de replicación del vector en bacterias; attR1 y attR2: sitios de recombinación; ccdB: gen letal; LB (left border) y RB (right border): sitios de transferencia mediada por *A. tumefaciens;* p35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; T35S: terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor; Egfp: gen codificante para la proteína verde fluorescente (GFP).