

Explorando el rol de factores de transcripción NAC en la regulación de *CV1* de soja



Joaquín Fernandez

Trabajo final de grado

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de ciencias, Universidad de la República

2024

Resumen

La soja es un cultivo de gran importancia a nivel nacional e internacional. Su grano constituye una fuente importante de proteínas y su producción está especialmente limitada por condiciones de estrés hídrico. En trabajos anteriores, se ha determinado que existe una vía de degradación cloroplástica independiente de autofagia, cuyo accionar es dependiente de una proteína central: CV. En soja se han identificado 2 genes que codifican para CV, *GmCV1* y *GmCV2*. La expresión de estos genes en cultivares de soja contrastantes fenotípicamente en relación a sus respuestas de resistencia/susceptibilidad al déficit hídrico, muestran que la expresión de genes CV se correlaciona negativamente con el grado de tolerancia al estrés hídrico. A su vez, *GmCV1* y *GmCV2* presentan regulaciones diferenciales: *GmCV1* se induce principalmente por estrés abiótico, mientras que *GmCV2* estaría involucrado en procesos de senescencia natural. Esta regulación diferencial *a priori* surge de la presencia de diferentes elementos regulatorios en *cis* presentes en el promotor de *GmCV1*. Entre estos se encuentran varios elementos de respuesta a factores de transcripción de la familia NAC: NAM (*no apical meristem*), ATAF1/2 (*Arabidopsis thaliana activating factor 1/2*) y CUC2 (*cup-shaped cotyledon*), caracterizados por presentar un rol importante en la compleja red de respuesta a situaciones que imponen estrés fisiológico tanto biótico como abiótico. “Explorando el rol de factores de transcripción NAC en la regulación de CV1 de soja” es un trabajo final de grado cuyo objetivo fue estudiar el rol de dos factores de transcripción de la familia NAC en la activación de *GmCV1* y analizar la relevancia funcional de elementos específicos del promotor para la activación del mismo. Concretamente, se generaron 2 construcciones génicas que permitirán expresar de manera inducible y condicional, 2 factores de transcripción NAC para poder a futuro determinar cómo éstos modulan la expresión del gen *GmCV1*. Ambas construcciones fueron incorporadas mediante transformación de flores mediada por *Agrobacterium*, en una línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* previamente desarrollada en el laboratorio, que expresa el gen reportero GUS bajo el control del promotor de CV1 de soja. Con las herramientas generadas en el marco del presente trabajo, se espera poder determinar la contribución de ambos factores de transcripción NAC a la regulación de la expresión de *GmCV1*.

Índice

Resumen.....	1
Índice.....	2
Nota inicial.....	4
Introducción.....	5
Contextualización.....	5
La soja: su importancia a nivel global y local.....	6
Nodulación y el estrés hídrico.....	8
La respuesta al déficit hídrico.....	9
Senescencia: primeros acercamientos.....	10
Senescencia: un proceso a macroescala.....	10
Senescencia inducida: el rol señalizador de los cloroplastos.....	11
Los cloroplastos como reservorios de nutrientes.....	12
Vías de degradación de cloroplastos.....	12
CV en soja.....	14
Estrés hídrico, senescencia y regulación de expresión génica.....	14
Contextualización del trabajo.....	16
Marco, objetivos y estrategia.....	17
Marco.....	17
Objetivos.....	17
Estrategia.....	18
Materiales y métodos.....	19
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	19
Protocolo de esterilización de semillas.....	19
Extracción de RNA.....	19
Síntesis de cDNA.....	20
Preparación de célula electrocompetentes de E. coli TOP10.....	20
Transformación de células electrocompetentes.....	21
Transformación de Arabidopsis thaliana.....	21
Electroforesis en gel de agarosa.....	22
Minipreparación de plásmidos por lisis alcalina.....	22
Minipreparación de plásmidos usando Zippy Plasmid Miniprep kit.....	22
Análisis bioinformático del promotor de GmCV1.....	23
Amplificación por PCR de GmORE1 a partir de cDNA.....	23
Amplificación por PCR de GmRD26 a partir de cDNA.....	24
Generación de vectores de entrada.....	25
Recombinación LR Gateway para generación de vectores binarios de destino.....	25
Purificación de fragmentos de DNA usando Zymo Clean.....	25
Extracción de DNA genómico de líneas transgénicas.....	25

Amplificación por PCR de gen de higromicina en líneas transgénicas.....	26
Resultados.....	27
Análisis del promotor de CV1.....	27
Análisis in silico de la expresión de los genes GmRD26 y GmORE1.....	29
Optimización de las condiciones de amplificación por PCR para genes de factores de transcripción NAC.....	30
Clonado de genes mediante tecnología Gateway.....	33
Generación de vector de entrada con GmRD26.....	34
Clonado de GmORE1 en el vector de entrada.....	36
Generación del vector binario de expresión condicional de GmRD26.....	37
Generación del vector binario para la expresión condicional de GmORE1.....	39
Transformación de Arabidopsis.....	41
Identificación y caracterización molecular de líneas transgénicas.....	43
Discusión.....	45
Promotor de CV1 & CV2.....	46
Rol de los factores NAC.....	46
Aislamiento de factores NAC.....	47
Generación de vectores de expresión transitoria.....	48
Ventajas y desventajas de la estrategia.....	49
Clonado de la secuencia de GmORE1.....	49
Transformación de Arabidopsis thaliana.....	50
Conclusiones y perspectivas.....	51
Anexo.....	52
Abreviaciones.....	52
Figuras anexas.....	53
Primeros pasos de clonado de GmORE1 en pENTR2B.....	56
Bibliografía.....	59

Nota inicial

“Explorando el rol de los factores NAC en la regulación de CV1 de soja” constituye para mí el cierre de mis estudios de grado. Este camino comenzó en marzo de 2020, bajo unas circunstancias atípicas para embarcarse en un nuevo desafío, pero que hoy cuatro años y medio después agradezco haber tomado. En el medio ocurrieron muchas cosas que me formaron hoy como profesional y como persona.

No quiero perder la oportunidad de agradecer a mi familia; a mis padres y a mi hermana, que estuvieron ahí para mí todos estos años, acompañando de cerca este camino. Estudiar es un privilegio, y si hoy llegué acá es gracias al apoyo y cariño que recibí de ellos. Quiero agradecer también a mis amigos y amigas por estar presentes y por siempre impulsarme a ir a más.

Un especial y fraterno agradecimiento a mis tutoras Sabina Vidal y Luciana Fleitas, dos personas increíbles con quienes tuve la oportunidad de descubrir el mundo de la biología molecular. Sin duda que sin ustedes dos, este camino hubiese sido totalmente diferente. Aprecio un montón su atención y dedicación conmigo, su paciencia, y su constancia en el trabajo. Valoro mucho su calidez y humanidad, que no dejaron de exhibir durante todo mi tiempo en el laboratorio. Realmente, gracias. A mis compañeros de BMV, quienes desde el momento cero me abrieron las puertas y me ayudaron con lo que fuese surgiendo.

Vivimos en un planeta donde conviven muchas realidades diferentes, donde existen muchas necesidades que requieren atención, y donde no siempre es fácil tender puentes. El paradigma actual de extractivismo exacerbado está teniendo un efecto fuerte en nuestro planeta y esto resulta preocupante. Un gran naturalista británico enunció recientemente: *“Si los jóvenes no crecen conociendo y apreciando a la naturaleza, no la entenderán, y si no la entienden, no la protegen... y si ellos no la protegen, entonces ¿quién lo hará?”* - David Attenborough.

A mi criterio, estamos en un momento bisagra, donde el futuro de la humanidad es incierto. Lo que sí es cierto es que los jóvenes necesitamos involucrarnos y participar activamente en la generación del cambio que queremos para las futuras generaciones. Yo quiero ser parte de ese cambio.



Joaquín Fernández Beramendi

Introducción

Contextualización

Desde tiempos remotos, el ser humano ha practicado la selección artificial de caracteres en diversas plantas y animales. Algunos autores destacan que la domesticación de especies representa el hito más significativo en los últimos trece mil años de la historia humana (Diamond, 2002). Evidencias arqueológicas y genéticas sugieren que cultivos fundamentales a nivel mundial, como el trigo o la cebada, comenzaron a ser seleccionados por humanos hace alrededor de 10.000 años (Doebley et al., 2006). Este proceso, exclusivamente humano, promueve el cruce selectivo de individuos de una misma especie con rasgos específicos. Un ejemplo destacado de esta modificación es el maíz, cuyo ancestro silvestre, el Teosinte, fue sometido a sucesivos eventos de hibridación y selección artificial (Doebley et al., 2006). En *'El origen de las especies'*, el naturalista Charles Darwin (1859) teoriza algo que al día de hoy parecería evidente: la naturaleza otorga variaciones sucesivas que el humano acumula y orienta, seleccionándolas en el sentido que más le conviene. Incluso plantea que hemos “creado” las razas que más provecho nos otorgan. Estos procesos de hibridación y selección han sido fundamentales para llevar a cabo modificaciones genéticas a nivel de especie.

En la actualidad, el avance de la biología molecular y nuevas tecnologías de ingeniería genética, han permitido acelerar los procesos de modificación genética y han aportado nuevos recursos genéticos, sorteando las limitaciones de especie que tienen las *'variaciones sucesivas'* provistas por la naturaleza o por los cruzamientos y procesos de selección dirigidos. En el año 1983, el equipo de Mary-Dell Chilton logró un hito significativo al desarrollar la primera planta modificada genéticamente en el laboratorio, un tabaco (*Nicotiana tabacum*) con resistencia a kanamicina (Bevan et al., 1983). Si bien los cruzamientos dirigidos continúan siendo un método de mejoramiento genético extendido, hoy en día, la ingeniería genética es una práctica establecida a nivel global, adoptada como medida para abordar problemas que enfrentan los productores como la proliferación de insectos, o el combate a especies competidoras con los cultivos. Por mencionar, algunos productos genéticamente modificados aceptados por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) para consumo son: Manzana (*Arctic™ Granny Smith*), Maíz (*Roundup Ready™*), Algodón (*Bollgard™ Cotton*), Papa (*Innate® Acclimate*), Canola (*Innovator™*) y Soja (*Roundup Ready™*) entre otros (U.S. Department of Agriculture, 2024).

Entre los años 1996 y 2020 los cultivos de organismos genéticamente modificados (OGMs) han generado, en productores que han implementado dichas tecnologías, ganancias aproximadas de 261 mil millones de dólares con respecto a aquellos que no implementaron estas prácticas. Particularmente en países en vías de desarrollo como Uruguay, se estima que por cada dólar

invertido en semillas de OGM se han recuperado 5,22 dólares en el mismo período de 25 años (Brookes, 2022).

Si bien el desarrollo de innovaciones en el agro ha traído consigo ganancias económicas, estadísticas y proyecciones globales indican que en un futuro próximo la industria agrícola sufrirá grandes problemas que se siembran en la actualidad. Los dos principales serían el incremento de la población mundial y las consecuencias del cambio climático, que se presentan como las mayores amenazas a la seguridad alimentaria de la humanidad (FAO, 2017). El Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas estima que para el año 2050 la población mundial alcanzaría la cifra de 9,7 mil millones de habitantes (UNDESA, 2022). En un informe publicado en 2009 por La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ya se planteaba de forma clara esta problemática: [existe] *la necesidad de aumentar la producción de alimentos para alimentar a una población en crecimiento, con una fuerza laboral rural en declive*. La presión está en la ciencia aplicada y la bioingeniería para paliar las consecuencias de estas nuevas problemáticas.

La soja: su importancia a nivel global y local

A nivel mundial y en orden decreciente, los principales cultivos producidos a nivel mundial en el año 2022 fueron: caña de azúcar, maíz, trigo, arroz, aceite de palma, papa y soja (FAOSTAT, 2022).

Si bien la soja (*Glycine max L. merr*) se encuentra séptimo en este ranking global, su importancia a lo largo del tiempo ha sido cada vez mayor: entre 1963 y 2007, su producción a nivel mundial incrementó siete veces (FAOSTAT, 2022).

Las leguminosas están en segundo lugar, después de los cereales, en cuanto a biodiversidad e importancia económica, proveyendo alrededor de un tercio de la proteína consumida por la población a nivel mundial (Smýkal et al., 2015). La soja es una planta de esta familia y es de altísima importancia en procesos biogeoquímicos, como la fijación de nitrógeno (N_2) atmosférico gracias al establecimiento de una relación simbiótica a través de sus raíces con rizobios (Foyer et al., 2016). Su grano constituye a nivel alimenticio una importante fuente de proteína y aceite de origen vegetal, donde se estima que entre el 39,4 y el 44,9% del peso del grano corresponde a proteína y entre el 14,0 y el 18,7% a aceite (Sharma et al., 2011). Además, contiene un alto perfil de isoflavonas (fitoestrógenos identificados como potenciales quimioprotectores) y es rico en compuestos como ácidos grasos insaturados, vitaminas del complejo B, fibra, hierro, calcio y zinc, entre otros (Rizzo & Baroni, 2018; Krížová et al., 2019). A escala global, los tres principales productores son Estados Unidos (34%), Argentina (30%) y Brasil (17%) (FAOSTAT, 2022). A la misma escala, China es por lejos el mayor importador de este producto, con la exorbitante cifra de

108 millones de toneladas, lo que representa el 62% de las importaciones globales del 2023 (USDA, 2024).

En Uruguay, específicamente, el área dedicada a este cultivo y la cantidad de producción ha crecido drásticamente en los últimos 20 años y, como se puede observar en la Figura 1, su producción se ha despegado en comparación con otros cultivos de verano como el maíz o el sorgo (FAOSTAT, 2022). Durante la campaña 2021/2022, casi 992 mil hectáreas de territorio fueron dedicadas a la plantación de soja. A modo de referencia, el área de producción dedicada al sorgo y el maíz en esa misma temporada combinados (alrededor de 172 mil hectáreas), apenas alcanzan el 17% del de la de soja (DIEA, 2023). En esta figura también se evidencia que las temporadas en las que Uruguay sufrió grandes periodos de sequía (2017/2018 y 2022/2023), se corresponden con aquellas que presentaron una reducida producción de los cultivos de verano (maíz, sorgo y soja) en comparación con otras temporadas y/o con respecto a la cebada (cultivo de invierno) cuya producción se mantiene aparentemente inafectada durante estas temporadas críticas.

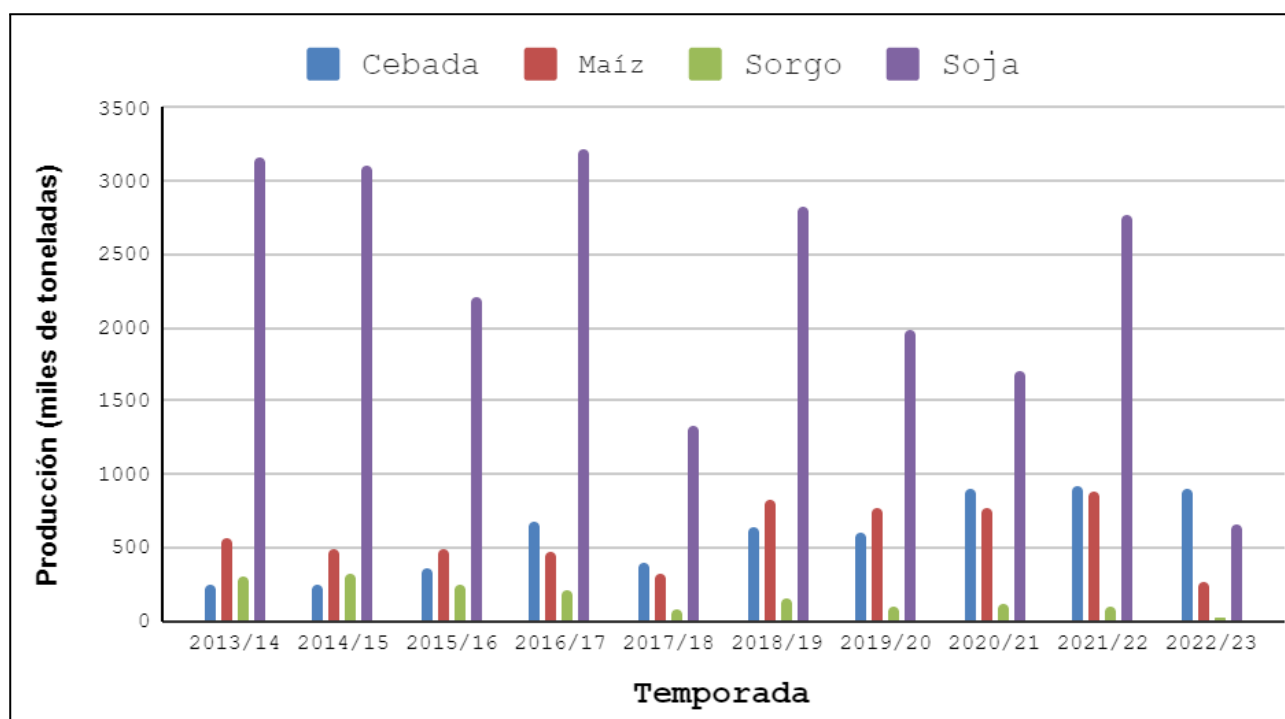


Figura 1. Producción (en miles de toneladas cosechadas) de cultivos en Uruguay entre la campaña de verano 2013/2014 y la de 2022/2023. En violeta se observa la producción de soja, en verde la de sorgo, en rojo la de maíz y en azul la de cebada. La información para construir el gráfico se obtuvo del Anuario Estadístico Agropecuario 2023 publicado por el MGAP Uruguay.

Diversas publicaciones, como la de Serraj et al. (1999) donde se concluyó que la soja es extremadamente sensible al estrés hídrico, y las de Sgroi (2021) o Wang et al (2020), donde se correlaciona el rendimiento del cultivo con períodos de sequía en diferentes partes del mundo, respaldan una aseveración semejante a los datos de la producción en nuestro país: el estrés por

sequía es sin duda la condición limitante en la producción de soja. Por tratarse de un cultivo de verano, que es habitualmente crecido bajo condiciones de secano (es decir, sin riego), la escasez de precipitaciones impacta especialmente el rendimiento del mismo.

Todo esto, hace que las investigaciones en clave de descifrar las respuestas de esta planta al déficit hídrico sean de gran importancia.

Nodulación y el estrés hídrico

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso mediante el cual determinados organismos, conocidos como *rizobios*, pueden convertir el nitrógeno atmosférico en amonio, estableciendo una relación simbiótica con leguminosas a través de las raíces. Esta relación biológica constituye la principal fuente natural de nitrógeno en sistemas terrestres y muchos productores a escala global emplean la misma como sustituto de la fertilización con fuentes inorgánicas de nitrógeno (Maluk et al., 2023). Durante este proceso, se forman estructuras llamadas nódulos, donde tiene lugar la fijación y el intercambio de nitrógeno y fotosintatos. Sin embargo, este proceso conlleva un alto costo energético, de aproximadamente 16 moles de ATP por cada mol de N_2 fijado en amonio por la nitrogenasa (Rascio & La Rocca, 2008). Según un estudio, en plantas de soja, la fijación de 1 gramo de N_2 requiere aproximadamente 9,5 gramos de glucosa (Heytler & Hardy, 1984).

Esta simbiosis está fuertemente influenciada por factores ambientales que limitan la actividad de fijación de nitrógeno y, por ende, el crecimiento de la planta asociada. Entre los más problemáticos se encuentran: las temperaturas extremas, la escasez de lluvia (especialmente en cultivos de secano), la baja tasa de fotosíntesis y los suelos de pH ácido (Zaharan, 1999). Se ha observado que los nódulos (en su período de iniciación, crecimiento y actividad) son más sensibles al déficit hídrico que otros tejidos vegetales (Albrecht et al., 1983; Marino et al., 2007; Zaharan, 1999). Especies como *Glycine max* o *Pisum sativum* muestran una reducción significativa en la capacidad de FBN ante la falta de irrigación del suelo (Zaharan, 1999).

De todo esto, inevitablemente se desprende la conclusión de que, una de las consecuencias importantes de la falta de riego en leguminosas es la fuerte disminución en la asimilación de nitrógeno.

Por otro lado, existe evidencia científica que respalda la idea de que el estado nodulado o no-nodulado de leguminosas, tiene un efecto en la capacidad de la planta de responder ante el estrés hídrico. Estudios realizados en diferentes especies de leguminosas como el de Amine-Khodja et al. (2022), Staudinger et al. (2016) o Cerezini et al. (2020) sugieren que el establecimiento de una relación de FBN en las raíces, resulta en un fenotipo de mayor tolerancia a la sequía. En Sainz et al. (2024) se investiga en mayor profundidad cuáles son los mecanismos moleculares (si los hay) que están en juego. En esta publicación se determinó que la respuesta a sequía en raíces de plantas de soja nodulada es más compleja en cuanto a la cantidad de genes

diferencialmente expresados. En el mismo, se compararon ambos estados y se constató que en la condición nodulada+sequía, genes relacionados a respuesta a ABA, transporte transmembrana y metabolismo de pigmentos, se ven resaltados en comparación con condición no-nodulada+sequía (Sainz et al., 2024). Si bien hay pocos estudios haciendo foco en este tema, varios de ellos (al menos los mencionados anteriormente) parecerían, al menos entre líneas, buscar posicionar a la FBN como un método para incrementar la resistencia a la sequía.

La respuesta al déficit hídrico

El estrés por déficit hídrico tiene como resultado una amplia variedad de cambios a nivel fisiológico y molecular en las plantas. A nivel fisiológico, destacan la pérdida de turgor celular, la inhibición de la fotosíntesis y la reducción en la capacidad de transporte de solutos a largas distancias (Sato et al., 2024). A nivel celular principalmente, se ve afectada la actividad de los fotosistemas, se genera estrés oxidativo por acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), se producen alteraciones en el metabolismo de enzimas y cambios a nivel de la regulación de la transcripción (Wang et al., 2018; Cardoso et al., 2022; Josafat et al., 2020). A grandes rasgos, las respuestas al déficit hídrico en plantas se pueden categorizar en 3 clases: evasión, tolerancia y escape.

Los mecanismos de evasión, como la limitación de la transpiración mediante el cierre de estomas o la promoción de la absorción de agua, apuntan a evitar o limitar la deshidratación de la planta, manteniendo el potencial hídrico aún en condiciones de estrés. Los mecanismos de tolerancia son aquellos que le permiten a la planta sobrevivir en condiciones de bajo potencial hídrico. Ejemplos de estos, incluyen el ajuste osmótico por la producción de solutos osmoprotectores, y/o la activación de vías de detoxificación de especies reactivas de oxígeno u otras especies reactivas (Jenks & Hasegawa, 2008; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2022).

Por último, los mecanismos de escape se basan en acelerar el ciclo de vida de la planta para alcanzar rápidamente estadios de flor y semilla, permitiendo que el ciclo se complete antes que la falta de agua alcance niveles críticos. Sin embargo, estos mecanismos pueden afectar negativamente la acumulación de biomasa y provocar pérdidas significativas en el número de semillas por planta (Farooq et al., 2016). Como ya fue mencionado, el estrés hídrico resulta en una disminución en la asimilación de carbono y nitrógeno. Ante la deficiencia de fuentes externas de estos macronutrientes, se removiliza carbono y nitrógeno ya asimilado hacia la formación de granos. Este proceso viene acompañado de un incremento en la senescencia prematura de órganos foliares (Hajibarat & Saidi, 2022). El aborto de grano es el proceso por el cual la planta aborta el desarrollo y llenado de algunas semillas, generando una disminución en la cantidad de granos producidos con respecto a los que podrían potencialmente ser producidos; se generan menos semillas, pero cuya viabilidad está asegurada (Tardieu et al., 2018). El estudio de Gao et

al. (2024) identificó que el aborto de granos en maíz a causa de sequía y salinidad es la principal fuente de pérdida productiva.

Senescencia: primeros acercamientos

La senescencia es una fase natural del desarrollo de las plantas, y constituye un proceso degenerativo de órganos que ocurre de forma coordinada. Involucra una compleja red de señales ambientales y del estado de desarrollo (Woo et al., 2018). La misma, permite el reciclado de macro- y micro- nutrientes alojados en órganos (como el nitrógeno, el carbono, el fósforo, el azufre, o el potasio) para ser empleados por órganos reproductivos o en crecimiento. La senescencia está caracterizada por la degradación de clorofila, proteínas, lípidos y RNAs en sus formas monoméricas o en formas de bajo peso molecular (Balazadeh et al., 2008; Sarwat et al., 2013). Implica una serie de eventos controlados tanto a nivel fisiológico como molecular que, a diferencia de otros procesos de muerte celular, como la necrosis (que ocurren de forma caótica), varias revisiones indican que este ocurre en forma ordenada y secuencial (Nooden et al., 1978; Nooden et al., 1997; Woolhouse, 1984; Diaz-Mendoza 2016; Bresson et al., 2018).

Senescencia: un proceso a macroescala

La senescencia puede ocurrir de forma natural o inducida. Dentro de la senescencia natural se identifican dos tipos: reproductiva y secuencial (o de órgano). La senescencia natural reproductiva, especialmente en plantas monocárpicas (que florecen una vez y luego mueren), implica la muerte de todo el organismo y constituye el estadio final del desarrollo que favorece la calidad de las semillas producidas (Miryeganeh, 2021; Leopold 1961; Metcalf et al., 2003). En el caso de estas plantas, la senescencia puede ser retrasada mediante la extensión artificial del estado vegetativo, por ejemplo, mediante la remoción de estructuras reproductivas (Kelly et al., 1988).

Por otro lado, la senescencia natural secuencial (o de órganos) ocurre de forma repetitiva en determinado estadio del desarrollo, una vez que el órgano en cuestión haya cumplido con su función. Esto permite reciclar los nutrientes de esos órganos hacia el desarrollo de otros que los necesiten (Miryeganeh, 2021). Un ejemplo de esto es la senescencia de hojas en otoño. Esto fue determinado experimentalmente en estudios como el de Keskitalo et al. (2005) donde de forma experimental se determinó que el peso seco de las hojas se reducía en promedio un 50% previo a la abscisión, durante esta temporada del año. En el mismo estudio, también se observó que en un período de 18 días se removilizó el 80% del nitrógeno y fósforo de las hojas senescentes (Keskitalo et al., 2005).

Senescencia inducida: el rol señalizador de los cloroplastos

La senescencia de hojas puede ser inducida tanto por factores bióticos (como patógenos o insectos) como abióticos. Entre estos últimos se identifican: el déficit hídrico, la alta salinidad, temperaturas elevadas, deficiencia de luz o de nutrientes y niveles altos de radiación UV-B (Guo & Gan, 2005; Woodson, 2019). Estos factores se consideran estresores, y como tales, pueden inducir un desbalance del estado redox celular, ocasionando estrés oxidativo (Quirino et al., 2000; Waszczak et al., 2018) y disparando la activación de programas de desarrollo sensibles a estímulos ambientales, como la senescencia (Dominguez & Cejudo, 2021).

Aunque son varios los compartimentos y sistemas enzimáticos que participan en la producción de especies oxidantes, los cloroplastos son organelos clave en la generación de estas especies reactivas. La transformación de energía lumínica a energía química suscitada por la cadena de transporte de electrones fotosintética, involucra reacciones de oxidación-reducción en las que inevitablemente se generan especies reactivas debido a la fuga de electrones desde los fotosistemas (Noctor et al., 2014). La naturaleza reactiva de estos intermediarios tiene dos implicancias fundamentales: la necesidad de que las células mantengan un estrecho control sobre su producción y propagación, y que los mismos puedan actuar como moléculas señalizadoras (Mittler et al., 2004).

Para enfrentar los posibles efectos negativos de estas especies oxidantes, la respuesta antioxidante de las plantas cuenta con componentes de bajo y alto peso molecular, entre los que se encuentran el glutatión, el ascorbato, el tocoferol, los carotenoides y una gran diversidad de proteínas de la superfamilia de las tiorredoxinas. Es sabido que el estado redox intracelular regula la expresión génica asociada a respuestas frente a diversos tipos de estrés biótico y abiótico. Es así que la interacción de los sistemas antioxidantes con especies oxidantes constituye una interfaz metabólica donde se definen procesos de aclimatación o de muerte (Rouhier et al., 2008; Foyer & Noctor, 2005).

Los cloroplastos en particular tienen sistemas de detoxificación enzimáticos fundamentales para mantener el balance redox. Los estudios de Ojeda et al (2017) con plantas de *Arabidopsis* mutantes en dos proteínas clave en la regulación y el metabolismo de redox cloroplástico (tiorredoxina reductasas dependientes de NADPH), mostraron un fenotipo de desarrollo retardado, reducida *performance* fotosintética y casi nula reducción dependiente de luz de la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Además, en el caso del doble mutante de estas proteínas, se observó la presencia de estructuras cloroplásticas aberrantes y consecuentemente una altísima tasa de mortalidad de las plántulas. Este tipo de ensayos ilustran la importancia de la homeostasis redox en la estabilidad de estos organelos (Ojeda et al., 2017).

Los cloroplastos como reservorios de nutrientes

Los plastidios conforman una familia de organelos presentes en células vegetales y algas, con diversas funciones, estructuras y una naturaleza altamente dinámica. Esta capacidad dinámica implica que, dependiendo del estadio del desarrollo y de señales ambientales, pueden interconvertirse entre sí. Entre los tipos de plastidios identificados se encuentran: proplastidios y etioplastos (en el desarrollo temprano), cromoplastos y cloroplastos (plastidios que almacenan pigmentos), amiloplastos, oleoplastos y leucoplastos (plastidios de almacenamiento de otros compuestos) y gerontoplastos (plastidios asociados con la senescencia) (Liebers et al., 2017).

Los cloroplastos, tienen la capacidad de convertir energía lumínica en energía química a través de una compleja vía metabólica que involucra algunas de las moléculas más abundantes de la biósfera. Estudios estadísticos indican que a nivel mundial, la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxygenasa (RubisCO) es la proteína soluble más abundante, el complejo captador de luz II (LHCII) es la proteína de membrana más abundante, las clorofilas son los pigmentos más abundantes, y el monogalactosil-diacil glicerol (MGDG) es el lípido más abundante (Ellis, 1979; Gounaris & Barber, 1983; Kirchhoff, 2019; Wilson et al., 2022). Además, se estima que la mayoría de los nutrientes en los tejidos fotosintéticos de plantas, están presentes en proteínas cloroplásticas. Entre el 75-80 % del nitrógeno total de plantas C3 se encuentra en estos organelos (Makino et al., 2003).

Esta dualidad de los cloroplastos como productores de energía y reservorios de nutrientes los posiciona en el centro de las distintas etapas del desarrollo de órganos fotosintéticos, incluyendo la senescencia. Durante este proceso, los cloroplastos son los primeros organelos en degradarse, mientras que el núcleo y las mitocondrias se mantienen hasta la etapa final (Buchanan-Wollaston et al., 2005).

Vías de degradación de cloroplastos

La degradación de los cloroplastos es un proceso coordinado, que implica el catabolismo y removilización de las proteínas, lípidos y pigmentos que allí se encuentran. Estos contenidos, deben ser vertidos en la vacuola central para su degradación, y múltiples vías de transporte desde un compartimento hacia el otro han sido reportadas (Dominguez & Cejudo, 2021; Zhuang & Jiang, 2019).

La autofagia es un proceso intracelular de degradación que participa en el recambio de componentes citoplasmáticos durante el desarrollo o en la respuesta al estrés ambiental. Se han reportado al menos 40 genes de esta familia en eucariotas, principalmente en levaduras y mamíferos, para algunos de los cuales se han identificado ortólogos en los genomas de plantas (Tang & Bassham, 2018). Mutantes deficientes de estos sugieren una implicación importante de estos genes en las rutas de degradación cloroplásticas (Kim et al., 2012).

En este sentido, la degradación de cloroplastos puede ser dependiente o independiente de un grupo de *genes dependientes de autofagia (ATG)* los cuales codifican proteínas que participan en la formación de autofagosomas (Wada et al., 2009). Las vías de degradación ATG dependientes identificadas hasta el momento son: *RubisCO-containing body (RCB)* (Chiba et al., 2003), *AT11-PS body* (Michaeli et al., 2014; Hoing et al., 2013) y *Starch granule-like structures (SSTG)* (Wang et al., 2013). Estas tres vías tienen la particularidad de que son vías de macroautofagia, a través de las cuales la degradación cloroplástica es total o parcial, generando vesículas de gran tamaño (de alrededor de 1 µm).

Por otro lado, las vías de degradación ATG independientes implican la formación de *vacuolas asociadas a senescencia (senescence associated vacuoles, SAVs)* y de *vesículas de vesiculación cloroplástica (chloroplast vesiculation containing vesicles, CVVs)*. Estas vesículas son de tráfico hacia la vacuola central donde se degradan sus componentes, y están ausentes en células vegetales no senescentes (Guo et al., 2021; Otegui et al., 2005). En el caso de las SAVs, éstas presentan intensa actividad proteolítica, como demostró Otegui et al. (2005) al fusionar la Cys proteasa SAG12, altamente expresada durante la senescencia, con GFP, identificando una actividad proteolítica significativa en estos compartimentos transitorios. En dichas vesículas se empaquetan proteínas como la RubisCO o la glutamina sintetasa 2, pero no proteínas tilacoidales (Martínez et al., 2008).

La vía de desensamblaje de cloroplastos mediante vesículas de vesiculación cloroplástica (CVVs) implica la participación de una proteína conocida como CV (por *chloroplast vesiculation*). Wang & Blumwald (2014) identificaron esta proteína con una señal de tránsito cloroplástica en su extremo N-terminal, cuya expresión se induce en condiciones de estrés abiótico y senescencia natural, y se reprime con tratamientos de citoquinina (una fitohormona que retrasa la senescencia). En este estudio, también determinaron que CV es un gen único en *Arabidopsis*, que se expresa fuertemente en hojas maduras y senescentes pero no en hojas jóvenes, de plantas viejas. En otro estudio realizado en arroz (*Oryza sativa*), se determinó que la expresión de OsCV se promovía en plantas de 9 semanas y en plantas sometidas a un tratamiento de sequía (10% agua en el sustrato) (Sade et al., 2017).

Existen robustas evidencias experimentales que muestran que la proteína CV interactúa con membranas tilacoidales, perturbando su estructura y eventualmente disgregándolas (Blumwald & Wang 2014). Las CVVs se generan a partir de estos fragmentos de membrana que interactúan con CV y pierden su integridad estructural. Dentro de estas vesículas se han identificado proteínas tilacoidales como PsbO (una subunidad del fotosistema II) y/o Tic20-II, lo cual sugiere que estas vesículas se originan desde el interior del cloroplasto. Además, se determinó que la formación y el tráfico de las CVVs es independiente de los mecanismos de autofagia descritos anteriormente. Para demostrar esto, los autores co-expresaron CV-RFP y GFP-ATG8a (una proteína estrechamente asociada a la vía autofágica) y observaron que las señales fluorescentes no

co-localizaban. Asimismo, se determinó que las plantas de *Arabidopsis* silenciadas para el gen CV mostraron una senescencia retardada en tratamientos por exposición a altos niveles de salinidad (NaCl) y estrés oxidativo (metilviológeno), al presentar una menor degradación de proteínas cloroplásticas (Blumwald & Wang, 2014).

CV en soja

En cuanto a la vía de vesiculación cloroplástica (CVV) en soja, un estudio reciente realizado por Fleitas et al. (2023) identificó que en el genoma de soja no existe uno, sino dos genes ortólogos a CV de *Arabidopsis* (At2G25625): *Glyma.06G072000* (*GmCV1*) y *Glyma.04G070000* (*GmCV2*). Estos genes parecen haber surgido de un evento de duplicación (parálogos) y lo interesante es que si bien CV parecería estar acotado al universo de las angiospermas, en el caso de las leguminosas cuyo genoma es conocido, sólo el trébol y la soja presentan el gen en dos copias (Fleitas et al., 2023), en contraste con la mayoría de las especies de este grupo que poseen una única copia del gen.

El rol de los genes CV de soja en las respuestas al déficit hídrico fue demostrado en estudios en los que se comparó el perfil de expresión génica entre dos variedades de soja con fenotipo contrastante frente a la sequía. En condiciones de déficit hídrico, la variedad sensible a estrés hídrico (cultivar TJS2049) mostró niveles de expresión de los genes CV mayores a los alcanzados en la variedad tolerante a dicho estrés (N7001) (Fleitas et al 2023, Gallino et al 2018). A su vez, los niveles de inducción de *GmCV1* fueron 10 veces mayores que los de *GmCV2*, lo que indicaría que *GmCV1* tiene un papel central (y mucho más relevante que *GmCV2*) en la vía de degradación de CVV inducida por estrés. Si bien los resultados del mismo estudio mostraron que ambos genes están diferencialmente regulados, a nivel de secuencia, un alineamiento de ambas proteínas nos indica que difieren muy poco, apenas en un 16% de identidad (Fleitas et al., 2023).

En cuanto al control a nivel de elementos en su región promotora, el estudio de Fleitas et al. (2023) concluye que *GmCV2* parecería estar fuertemente atenuado ante la aplicación de citoquininas exógenas, mientras que *GmCV1* no parecería estar bajo el control de esta hormona. Esto indicaría que, a pesar de posiblemente haber surgido de un evento de duplicación, la funcionalidad de ambos ha evolucionado a nivel de sus regiones promotoras, para responder ante distintos estímulos (Fleitas et al., 2023). Si bien en el mismo estudio se observó que proCV1 presenta mayores niveles de inducción ante tratamiento con varias hormonas, la mayor respuesta inductora se observó ante la aplicación de ABA y Auxina lo que sostiene aún más esta teoría.

Estrés hídrico, senescencia y regulación de expresión génica

La senescencia es un proceso acompañado por un profundo cambio en los niveles de expresión de miles de genes, entre los cuales se encuentran los *genes asociados a la senescencia* (SAGs).

NON-YELLOWING-1 (NYE1), SENESCENCE-ASSOCIATED GENES 113 (SAG113), o SMALL AUXIN UP RNA GENES (SAUR36), son ejemplos de estos. Se han identificado muchos reguladores transcripcionales que controlan la expresión de SAGs, entre ellos los factores de transcripción de las familias NAC, WRKY, ERF y MYB (Cao et al., 2023).

En particular, la familia de factores NAC (*No Apical Meristem, Arabidopsis Transcription Activation Factor, Cup-Shaped Cotyledon*) se destaca por presentar casi en su mayoría, funciones de regulación positiva de la senescencia (Podzimska-Sroka et al., 2015). Por ejemplo, ANAC032 modula positivamente la senescencia natural e inducida de *Arabidopsis* por activación de vías de síntesis de especies oxidantes (especialmente H₂O₂) y la expresión de SAGs (Mahmood et al., 2016). Otro ejemplo es AtNTL4, cuya unión directa al promotor del gen que codifica para la NADPH oxidasa regula positivamente su transcripción (promoviendo así la producción de especies oxidantes) (Lee et al., 2012).

Dado que la expresión de *GmCV1* muestra una correlación negativa con la tolerancia a sequía en soja, es posible presuponer que, si se logra disminuir los niveles de inducción por estrés de *GmCV1*, se podría incrementar la tolerancia a sequía en esta especie.

Visto esto, dilucidar cómo funcionan los mecanismos de regulación de la transcripción de *GmCV1*, es de gran importancia. Comprender cómo es esta regulación y quiénes son actores importantes en ella, habilitará a desarrollar estrategias para retrasar la senescencia inducida por estrés hídrico. Un posible regulador de la transcripción de *GmCV1* podría ser el ortólogo en soja de *ORE1* (*At5g39610*), un factor de transcripción NAC identificado en *Arabidopsis* como uno de los factores clave en la regulación de la senescencia de hojas. En un principio, se identificó un mutante de *Arabidopsis* en este gen que presentaba senescencia retardada. Estudios posteriores determinaron que dicha mutación, correspondía con una delección de 5 pb generaba dicho fenotipo (Kim et al., 2009). De forma similar y unos años antes, Woo et al (2004) describieron 3 mutantes del mismo gen con el mismo fenotipo de senescencia retardada.

En otro estudio en la misma especie, se identificó que la expresión de *AtORE1* se induce ante tratamientos de alta salinidad, heridas mecánicas, y en menor medida ante otros tratamientos conocidos por desencadenar procesos de senescencia como oscuridad y aplicación de azúcares externos (glucosa) (Balazadeh et al., 2010). La sobreexpresión de *AtORE1* resulta en un fenotipo de senescencia acelerada (Balazadeh et al., 2010). Matallana-Ramirez et al. (2013) reportan que en *Arabidopsis*, este factor regula directamente la expresión de BFN1, una nucleasa de tipo 1 cuya expresión se induce en hojas, tallos y flores durante la senescencia asociada al desarrollo (Matallana-Ramirez et al., 2013). A su vez, la expresión de proCV1:GUS en *Arabidopsis* muestra un patrón acumulación de GUS en diversas condiciones de estrés y del desarrollo, muy similar al perfil de expresión de *GmORE1* (Fleitas et al 2023), evidenciando que estos dos genes se coexpresan.

Otro factor de transcripción de la familia NAC que podría participar en la regulación de *CV1* es el ortólogo de *RD26* de *Arabidopsis* (*At4g27410*). A través de ensayos de microarray, Shou et al. (2016) determinaron que los niveles de transcrito de *AtRD26* aumentaban durante la progresión de la senescencia de hojas.

Este factor ha sido identificado, por un lado como un modulador transcripcional inducible en respuesta a ABA, bajo condiciones de salinidad o estrés hídrico, y por otro como un regulador negativo de la respuesta a Brasinoesteroides (otro tipo de fitohormona) (Jiang et al., 2019). Diferentes estudios han concluido que *AtRD26* y sus homólogos, participan en la modulación de expresión de genes relacionados a senescencia inducida por oscuridad, edad y estrés hídrico (Tran et al., 2004; Shou et al., 2016).

En un artículo publicado por Kamranfar et al. (2018) se identificó a *AtRD26* como un activador del gen *CV* en *Arabidopsis*. En el mismo, los autores expresaron este factor y observaron senescencia de hojas a simple vista 48 horas después de la inducción. Además, por ensayos de qRT-PCR determinaron que en ese lapso hubo un incremento en la expresión de los genes *SAG12* y *SAG13* (ambos relacionados a la senescencia). En cuanto a la expresión de *CV*, apenas 5 horas después de la inducción de la expresión de *AtRD26*, se observó un aumento de la expresión de este gen en 3,7 veces. En este estudio se determinó la presencia del sitio de unión para *AtRD26* en la región promotora de *CV*, en la posición -385 respecto al sitio de inicio de la traducción (Kamranfar et al., 2018).

Contextualización del trabajo

Este trabajo se enmarca en el contexto de un proyecto Fondo Clemente estable titulado: “*Relevancia y regulación de la ruta de vesiculación cloroplástica en las respuestas al déficit hídrico de la soja*” (FCE 2023 1 176096).

Este proyecto tiene como objetivo profundizar en el estudio de la regulación y función del gen *CV1* (*chloroplast vesiculation 1*) de soja, cuya actividad parece estar asociada negativamente con la tolerancia a la sequía. Los genes *CV* están presentes en angiospermas y están involucrados en la degradación de los cloroplastos durante la senescencia natural e inducida por estrés. Esta degradación está vinculada a la removilización de nitrógeno y cambios en la capacidad fotosintética, procesos cruciales para la productividad de los cultivos. *CV1* se expresa tanto en las hojas como en las raíces, sugiriendo que podría desempeñar un papel en tejidos no fotosintéticos. El proyecto busca determinar dónde se localiza *CV1* dentro de las células de las raíces y, evaluar su importancia en la nodulación, actividad nodular y movilización de nitrógeno.

Además, se investigará cómo se regula la expresión de *CV1* durante el crecimiento de la planta y en respuesta a la sequía. Específicamente, se estudiará la influencia de los factores de transcripción NAC en la activación de *CV1* y se analizará la importancia funcional de elementos

específicos del promotor para la activación génica. Finalmente, se empleará CRISPR/Cas9 para modificar los elementos reguladores del promotor con el objetivo de ajustar la expresión del gen ante la sequía.

Marco, objetivos y estrategia

Marco

Conocer en profundidad los mecanismos de regulación de CV1 de soja es de gran importancia, puesto que estos conocimientos podrían ser empleados para modular su expresión y así poder desarrollar estrategias moleculares para reducir la senescencia inducida por estrés hídrico. Previamente, nuestro grupo de trabajo generó líneas transgénicas de *Arabidopsis* conteniendo el gen reportero GUS bajo el control del promotor de CV1 de soja (1500 pb *upstream* del sitio de inicio de la traducción). Este sistema fue empleado en el trabajo de Fleitas et al. (2023), para determinar que efectivamente CV1 se expresa tanto en hojas como en raíces, en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico.

En este trabajo emplearemos estas líneas transgénicas de *Arabidopsis*, y veremos si los posibles ortólogos de RD26 y ORE1 en soja, tienen un efecto sobre la actividad del promotor de CV1 de soja.

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de dos factores de transcripción de la familia NAC en la activación de CV1 de soja y analizar la relevancia funcional de elementos específicos del promotor para la activación del mismo. Específicamente, este trabajo se centró en el estudio de los genes *Glyma.06G248900* y *Glyma.05G025500*, que surgen como posibles ortólogos de *AtRD26* y *AtORE1* de *Arabidopsis*, respectivamente.

Se espera determinar de qué manera la sobreexpresión de los genes ortólogos de soja, *GmORE1* y *GmRD26*, afectan la actividad del promotor de *GmCV1* en plantas de *Arabidopsis* transgénicas proCV1:GUS (Fleitas et al., 2023).

Los objetivos específicos fueron:

- Obtener construcciones génicas que permitan la expresión de cada factor de transcripción, bajo el control de un promotor sintético inducible.
- Obtener plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas proCV1:GUS, que expresen condicionalmente *GmRD26* o *GmORE1* en respuesta a una condición de inducción química.
- Caracterizar a nivel molecular la incorporación de las construcciones en el genoma de las plantas.

Estrategia

Se aislaron y clonaron las secuencias codificantes de *GmORE1* y *GmRD26*, se generaron construcciones génicas que permitieron la expresión condicional de las secuencias codificantes bajo el control de un promotor inducible por β -estradiol. Se transformaron estas construcciones sobre líneas transgénicas de *Arabidopsis* portadoras de la construcción proCV1:GUS (Fleitas et al., 2023) y se identificaron las líneas transgénicas. Con estas plantas, se podrá determinar cómo varían los niveles de actividad GUS al promover la expresión de *GmORE1* y *GmRD26* con β -estradiol en un sistema heterólogo.

Materiales y métodos

En la presente sección se detallan los materiales y métodos empleados en la realización de este trabajo.

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las plantas de soja empleadas para este trabajo fueron *Glycine max* (L. merr) del cultivar Williams 82 en estadio reproductivo 1 (R1). Las mismas fueron cultivadas en turba:perlita 2:1 y régimen de fotoperíodo 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a 25 °C. Las lámparas empleadas para el crecimiento son de halogenuro metálico y de vapor de sodio a alta presión con una intensidad lumínica de 800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$. Fueron regadas periódicamente y fertilizadas semanalmente con Hakaphos rojo 1 g/L.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan el gen reportero β -glucuronidasa bajo el control del promotor de *GmCV1* (proCV1:GUS) fueron obtenidas del trabajo de Fleitas et al. (2023). Las mismas fueron esterilizadas de acuerdo al protocolo planteado en esta sección. Para su germinación, las semillas fueron estratificadas en placas de con medio Murashige y Skoog (MS) $\frac{1}{2}$ durante 4 días a 4 °C y posteriormente germinadas *in vitro* en presencia de fosfinotricina en régimen de fotoperíodo 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a 25 °C. Las plántulas con los dos cotiledones expandidos fueron trasplantadas a macetas pequeñas en turba. Se crecieron en cuarto de cultivo con las características mencionadas (16:8, 25 °C) hasta que desarrollaron un buen número de botones florales. Se cortaron las inflorescencias primarias para favorecer el crecimiento de nuevas inflorescencias.

Protocolo de esterilización de semillas

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) fueron esterilizadas superficialmente empleando un protocolo de esterilización con hipoclorito de sodio. Brevemente, las semillas se suspendieron en 1 mL de EtOH 70% durante 4-5 minutos. Se removió el EtOH y se agregó 1 mL de una solución de esterilización (Hipoclorito 25 g/L, Tritón 0,1x y H₂O Mili-Q). En esta etapa los tubos se dejaron en rotación orbital por 15 min. Finalmente, se lavaron las semillas al menos 5 veces con H₂O Mili-Q estéril.

Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA total a partir de plantas de soja (*Glycine max* L. merr) de la variedad Williams 82. Para las extracciones de RNA de flores, las plantas fueron cultivadas hasta alcanzar su estadio R1. Paralelamente, plantas en estadio vegetativo V5 fueron sometidas a

condiciones de déficit hídrico. Para ello, se detuvo el riego hasta observar síntomas de marchitamiento. En cada caso, las muestras de tejido fueron colectadas e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -86 °C hasta su utilización.

Para la extracción de RNA a partir de flores, se empleó el kit RNeasy Plant mini kit (Cat. No. 74904) de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

Por otro lado, para la extracción de RNA a partir de hojas, se empleó un método estándar de extracción en fenol-cloroformo y precipitación selectiva en LiCl. Para el mismo entre 0,5-2,0 gr de material vegetal fueron transferidos a un mortero. Se agregó nitrógeno líquido hasta cubrir la muestra y se procedió a moler hasta que quedó un fino polvo. Posteriormente, se transfirió el polvo a un falcon de 50 mL con 2,5 mL de fenol ácido y 5 mL de NTES (NaCl 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M pH 7,5, EDTA 1 M, SDS 1%). Se vortexeó ~30 segundos y luego se le agregaron 2,5 mL de solución cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1. Se centrifugó durante 20 minutos a 5000 rpm y luego se transfirió el sobrenadante (fase acuosa) a un nuevo tubo falcon de 50 mL. Se agregaron 600 µL de acetato de sodio 3 M (NaAc, libre de RNAsa) y 2,5 volúmenes de EtOH 95%. Esta mezcla se incubó a -20 °C ON. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó durante 20 minutos a 10000 rpm, 4 °C. Se volcó el sobrenadante, se secó el pellet y se resuspendió este último en 750 µL de H₂O Mili-Q tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se incubó en hielo durante 10 minutos. Se agregaron 750 µL de LiCl 4 M y se incubó a ~0 °C ON. Al día siguiente, se centrifugó durante 20 min a 12000 rpm, se secó el pellet y se resuspendió en: 300 µL de H₂O Mili-Q tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), 30 µL de NaAC 3 M y 800 µL de EtOH 95%. Finalmente, se centrifugó durante 20 min a 12000 g, se secó el pellet y se resuspendió en 30 µL de H₂O Mili-Q DEPC. Todos los extractos de RNA fueron almacenados en freezer a -86 °C hasta su uso.

Para verificar la integridad del RNA extraído se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% revelado bajo luz UV empleando Bromuro de etidio como agente intercalante.

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se empleó el RevertAid First strand cDNA synthesis Kit (Cat. no. K1621) de Thermo Scientific. Previo a la reacción, se agregaron 2 µL de DNasa I (Cat. No. EN0521) de Thermo Scientific. Se partió de 1 µg de RNA tratado (como molde de reacción) y cebadores oligo(dT)₁₈.

Preparación de célula electrocompetentes de *E. coli* TOP10

El protocolo de preparación de células electrocompetentes empleado fue el descrito por Miller & Nickoloff (1995). Se empleó el mismo protocolo tanto para la preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* como de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se inocularon 500 mL de medio LB líquido con 5 mL de un precultivo de *E. coli TOP10* crecido ON. Se creció el inóculo a 37 °C, 300 rpm hasta obtener un OD_{600 nm} de 0,5 - 0,7. Alcanzado este valor, se enfrió el cultivo por ~20 min en hielo y se mantuvo durante el resto del protocolo a temperaturas cercanas a 0 °C. Se transfirió el cultivo a 2 botellas de centrifuga de 200 mL y se centrifugó a 4 °C, 4000 g durante 15 minutos. Luego, se volcó el sobrenadante a parte y el pellet fue resuspendido en 500 mL de una solución 10% glicerol y H₂O Mili-Q. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 4 °C, 4000 g durante 15 minutos, se volcó el sobrenadante a parte y se volvió a resuspender, esta vez en la misma solución pero en 250 mL. Por último, se repitió el paso de centrifugado, resuspendiendo esta vez en 2 mL de la solución de glicerol 10% en H₂O Mili-Q. Esta solución fue alícuotada en fracciones de 50 µL en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Los mismos fueron inmediatamente enfriados en nitrógeno líquido y luego almacenados en freezer a -86 °C hasta su uso.

Transformación de células electrocompetentes

Para la transformación se empleó el equipo de electroporación Gene Pulser XCell de Biorad. Las celdas usadas fueron esterilizadas con EtOH 70% y posteriormente lavadas con H₂O Milli-Q. Una vez secas, se adicionó a la celda la alícuota de 50 µL de células electrocompetentes junto con una cantidad adecuada de plásmido a transformar (1-2 µL). En este trabajo se transformaron células de *E. coli* y de *A. tumefaciens* empleando parámetros predefinidos por el equipo. Posteriormente, se recuperaron durante 1 hora a 200 rpm en 200 µL de medio líquido: LB (en caso de *E. coli*) o YEP (en caso de *A. tumefaciens*) y temperatura adecuada de crecimiento (37 °C para *E. coli* y 28 °C para *A. tumefaciens*). Por último, se plaquearon los 250 µL de cultivo recuperado en una placa de LB agar 1,5 % con su agente de selección correspondiente (kanamicina 100 µg/mL para *E. coli* o rifampicina, espectinomicina, y carbenicilina a 100 µg/mL para *A. tumefaciens*) durante 24 h a temperatura adecuada.

Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas de *Arabidopsis* Col-0 proCV1:GUS (Fleitas et al. 2023) fueron transformadas mediante un protocolo de inmersión floral (Clough & Bent, 1998). Una vez que las mismas alcanzaron un buen número de botones florales se procedió a la transformación. Para ello se crecieron cultivos de 15 mL de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores binarios de interés en medio YEP con agregado de rifampicina, espectinomicina, y carbenicilina a 100 µg/mL. Se dejó en agitación a 200 rpm y 28 °C, ON o hasta alcanzar una DO_{600 nm} de aprox 2.

Luego, el cultivo se centrifugó durante 10 min a 3000 g y el pellet se resuspendió en 15 mL de solución de infiltración. La misma, se prepara por adición de MS ½ 2,2 g/L, sacarosa (calidad para análisis) 50 gr/L y detergente Silwett-L77 0.05 %. Posteriormente, se aplicó una gota de solución

en cada botón floral de la planta y finalmente se cubrió cada planta con una lámina de plástico durante 24 h para evitar la rápida evaporación de la solución.

Electroforesis en gel de agarosa

Los geles de agarosa fueron realizados con buffer TAE 1X (tris 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM) y agarosa a concentración 1% (para resolución de fragmentos de entre 2 y 0,3 kb). Como agente intercalante se empleó bromuro de etidio a concentración final 0,05 µg/mL. La corrida se realizó a 8,0 V/cm y el revelado se realizó bajo luz UV en transiluminador. En todos los casos se empleó el marcador de peso molecular λ-PstI, cuyo patrón de bandas y correspondiente peso molecular de cada una se pueden verificar en el siguiente link: <https://www.geneon.net/products/dna-ladders/phage-lambda-dna-psti-digest-ready-to-use/>.

Minipreparación de plásmidos por lisis alcalina

El protocolo de minipreparación empleado es una adaptación del descrito por Birnboim & Doly (1979). Para el mismo, se centrifugaron durante 3 minutos a 15000 rpm, 2-3 mL de precultivo bacteriano con agente de selección crecido ON. El mismo se resuspendió en 300 µL de solución P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNAsa A 100 µg/mL). El paso de lisis alcalina se realizó con 300 µL de solución P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) durante un tiempo máximo de 4 minutos. La neutralización se realizó con 300 µL de solución P3 (acetato de potasio 1,5 M, ácido acético glacial 86,25 mM). Luego, se centrifugó durante 10 minutos a 15000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga cuidando de no aspirar nada del pellet. Al mismo, se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol y se centrifugó nuevamente a 15000 rpm, por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 600 µL de EtOH 70%. Por último se removi6 la mayor cantidad posible de líquido (cuidando de no desagregar el pellet) y se secó durante 2 minutos a 65 °C o hasta que se verificó que el tubo estuviera seco. Finalmente, se resuspendió el DNA plasmídico en 30 µL de H₂O Mili-Q.

Minipreparación de plásmidos usando Zippy Plasmid Miniprep kit

Para la minipreparación de plásmidos usando el kit de Zymo Research, Zippy Plasmid Miniprep kit (Cat. No. D4036) se siguió el protocolo estipulado por el fabricante. Para la misma, se agregaron 1 mL de cultivo bacteriano crecido en medio LB a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se añadieron 100 µL de Buffer de Lisis 7X (Azul) y se mezcló invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces. Después de la adición del Buffer de Lisis 7X, la solución cambió de opaca a azul claro, indicando una lisis completa. Se agregaron 350 µL de Buffer de Neutralización Frío (Amarillo) y se mezcló completamente. La muestra se volvió amarilla (neutralización completa) y se formó un precipitado amarillento. Se invirtió la muestra de 2 a 3 veces adicionales para asegurar una neutralización

completa. Se centrifugó a 15000 rpm durante 2-4 minutos. Se transfirió el sobrenadante (~900 µl) a la columna Zymo-Spin™ IIN proporcionada. Se evitó perturbar el pellet de residuos celulares. Se colocó la columna en un tubo de recolección y se centrifugó durante 15 segundos. Se descartó el eluido y se volvió a colocar la columna en el mismo tubo de recolección. Se añadieron 200 µl de Buffer de Lavado Endo a la columna. Se centrifugó durante 30 segundos. No fue necesario vaciar el tubo de recolección. Se agregaron 400 µl de Buffer de Lavado Zyppy™ a la columna. Se centrifugó durante 1 minuto. Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml, luego se agregaron 30 µl de Buffer de Elución Zyppy™ directamente a la matriz de la columna y se dejó reposar durante un minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 30 segundos para eluir el ADN plasmídico.

Análisis bioinformático del promotor de *GmCV1*

El análisis bioinformático del promotor del gen *GmCV1* fue realizado con la versión Wm82.a6.v1 del genoma de *Glycine max* disponible en Phytozome DOE-JGI, https://phytozome.jgi.doe.gov/info/Gmax_Wm82_a6_v1. Se consideraron 1500 pares de bases río arriba desde el sitio de inicio de la transcripción para el mismo. La identificación de elementos de respuesta en la secuencia del promotor fue realizada empleando el software PlantPan 4.0 (Chow et al., 2024) y PlantCARE disponibles online (Rombauts et al., 1999).

Amplificación por PCR de *GmORE1* a partir de cDNA

La amplificación de *GmORE1* (*Glyma.05G025500*) se realizó a partir de cDNA de soja de la variedad Williams 82 empleando un protocolo de PCR de dos pasos. El primer paso se realizó empleando primers perfectamente complementarios a los extremos 5' y 3' UTR del transcrito: FwORE1 (CCGAGGCTCTTGTTGTTTCCT) y RvORE1 (ACGTTTCTTCCTCCTCCCC), y la polimerasa MyFi de Meridian Bioscience (Cat. No. BIO-25049). El protocolo de ciclado se resume en la tabla 1. Los sitios de restricción *KpnI* y *NotI* fueron añadidos al amplicón mediante el segundo paso de PCR (como molde se empleó 0,1 ng del producto de PCR de la amplificación primaria) para el cual se emplearon los primers: FwORE1-*KpnI* (TTTGGTACCATGGAAAA CGTTCCGGCGG) y RvORE1-*NotI* (TTATGCGGCCGCTTAGTAATTC CACAAACCATCAAGATCC) y la polimerasa DreamTaq de Thermo Scientific (Cat. No. EP0701). El protocolo de ciclado se resume en la tabla 2.

Tabla 1. Protocolo de amplificación por PCR a tiempo final de GmORE1 desde sus regiones 3' y 5' UTR a partir de cDNA.

Desnaturalización inicial	95 °C	1 min	x1
Desnaturalización	95 °C	15 seg	x35
Hibridación	49 °C	45 seg	
Extensión	72 °C	1 min 30 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	x1

*Este protocolo fue puesto a punto en un PCR en gradiente de temperatura para 43, 45, 47, 49 y 51 °C, donde 49 °C demostró ser la temperatura de hibridación que resultaba en mayor amplificación del producto.

Tabla 2. Protocolo de amplificación por PCR a tiempo final de GmORE1 de su región codificante, empleando como molde 0,1 ng del producto de amplificación primaria.

Desnaturalización inicial	95 °C	2 min	x1
Desnaturalización	95 °C	30 seg	x5
Hibridación	46 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	1 min	
Desnaturalización	95 °C	30 seg	x30
Hibridación	59 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión Final	72 °C	3 min	x1

Amplificación por PCR de GmRD26 a partir de cDNA

Para la amplificación de *GmRD26* (*Glyma.06G248900*) a partir de cDNA se empleó el siguiente set de primers: FwRD26-*KpnI* (GAGGGTACCATGGGAGTTCCAGAGAGAGA) y RvRD26-*XhoI* (ATCCCTCGAGT CACTCCCTAACCCCGAACCCAAC). Se empleó la polimerasa DreamTaq (Cat. No. EP0701) y el protocolo de ciclado empleado se visualiza en la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de amplificación por PCR a tiempo final de GmRD26 empleando como molde cDNA.

Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos	x1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	x35
Hibridación	50 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	5 minutos	x1

Generación de vectores de entrada

Los vectores de entrada fueron generados empleando el vector pENTR-2B (Thermo Fisher Scientific). El mismo fue clivado en su sitio de policlonado con 2 enzimas que permitieran clonar allí las secuencias que codifican para los factores de transcripción (previamente amplificados por PCR y con su extremo digerido con las enzimas correspondientes). Las enzimas empleadas para la generación de vectores de entrada fueron: para *GmRD26* pENTR-2B *KpnI* & *XhoI*, para *GmORE1* pENTR-2B *KpnI* & *NotI*.

Una vez digerido el vector, se desfosforilaron sus extremos usando la enzima Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Cat. No. EF0651) por 10 min a 37 °C. Posteriormente se desactivó la enzima durante 15 min a 65 °C.

Luego, se creó una mezcla de ligación con el plásmido doblemente digerido y desfosforilado, junto con una cantidad de inserto en relación 3:1 de inserto a plásmido. La ligación fue llevada a cabo con la enzima T4 DNA Ligase (Cat. No. EL0011) a ~24 °C ON. Luego de transcurrido el tiempo de reacción, se inactivó la enzima durante 10 min a 65 °C.

Recombinación LR Gateway para generación de vectores binarios de destino

Para el clonado LR, usamos la Gateway LR Clonase II Plus Enzyme Mix (Cat. No. 12538120) de Invitrogen. La reacción se preparó agregando 10 fmoles de vector de entrada (pENTR2B + NAC) y 20 fmoles del vector de destino (pMDC7) en buffer TE pH 8. La misma se incubó durante 16 h a ~24 °C. Finalmente, se agregó 1 µL de Proteinasa K (Cat. No. EO0499) y se incubó a 37 °C durante 10 min para inactivar la clonasa. El vector de destino empleado fue el pMDC7, el cual deriva del vector pER8 (Zuo et al., 2000).

Purificación de fragmentos de DNA usando Zymo Clean

Para la purificación de los fragmentos amplificados por PCR se empleó el Kit Zymo Clean DNA Clean & Concentrator - 5 (Cat. No. D4014) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Extracción de DNA genómico de líneas transgénicas

Para la extracción de DNA genómico (gDNA) a partir de muestras vegetales, se empleó el siguiente protocolo. Se colectaron en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL con 2 perlas de Zirconio, una muestra de 1 cm² de hoja de cada línea seleccionada. Las muestras fueron inmediatamente enfriadas en nitrógeno líquido y preservadas a temperaturas por debajo de -80 °C hasta su uso. Se molieron en un disruptor de tejidos durante 30 segundos y se les agregó 700 µL de buffer CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7,5-8, 1% v/v 2-mercaptoetanol). Posteriormente, los tubos fueron incubados a 65 °C durante 30 minutos, tiempo en el cual fueron invertidos a intervalos de 10 minutos. Una vez completado esto, los tubos

fueron enfriados a temperatura ambiente. Luego se agregó 600 μ L de una solución cloroformo con alcohol isoamílico (en proporción 24:1) a cada tubo, se invirtieron 5 a 6 veces y luego se centrifugaron por 20 minutos a 10000 rpm. Después, se transfirió la fase acuosa (menos densa) a nuevos tubos de microcentrífuga y se precipitó el DNA genómico de cada uno con un volumen igual de isopropanol. Se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado de DNA por agregado de 1 mL de etanol 70% y centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, se secó el pellet y se resuspendió en 30 μ L de buffer TE (10 mM Tris y 1 mM EDTA).

Amplificación por PCR de gen de higromicina en líneas transgénicas

Para la amplificación de higromicina a partir de gDNA se empleó el siguiente set de primers: Fw-hyg (GAGCCTGACCTATTGCATCTC) y Rv-hyg (GATGTTGGCGACCTCGTATT). Se empleó la polimerasa DreamTaq (Cat. No. EP0701) y el protocolo de ciclado empleado se visualiza en la tabla 4.

Tabla 4. Protocolo de amplificación por PCR a tiempo final de Higromicina empleando como molde gDNA.

Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos	x1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	x35
Hibridación	50 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	5 minutos	x1

Resultados

Análisis del promotor de CV1

Para identificar posibles elementos reguladores en *cis*, presentes en el promotor de CV1 de soja, se realizó el análisis *in silico* de una secuencia de 1500 pares de bases (pb) corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, usando dos softwares bioinformáticos: PlantPAN 4.0 y PlantCARE. En la Figura 2 se pueden observar los elementos identificados entre -1500 y +1 pares de bases del promotor, así como la secuencia correspondiente al extremo 5'-UTR marcada.

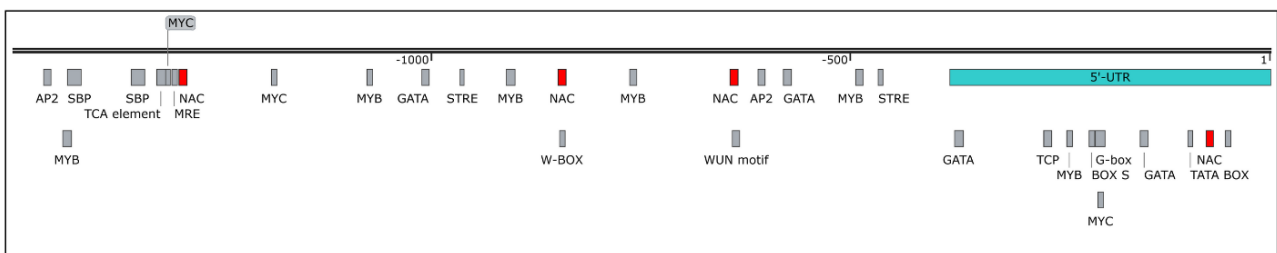


Figura 2. Diagrama del promotor de GmCV1 con los elementos de respuesta identificados empleando herramientas bioinformáticas. En rojo se pueden observar potenciales elementos de respuesta a factores de transcripción NAC (NAM: no apical meristem, ATAF1/2 y CUC2: cup-shaped cotyledon). En gris se observan otros elementos de respuesta para factores de transcripción AP2 (APETALA2), MYC (myelocytomatosis), G-box, MYB (v-Myb myeloblastosis viral oncogene homolog), GATA, STRE (stress response element), W-BOX (WRKY element), TCA (salicylic-acid responsive element), TCP (*ZmTB1*: teosinte branched1, *AmCYC*: cycloidea, PCF1/2: proliferating cell nuclear antigen factor 1 and 2), SBP (squamosa promoter binding protein-like), MRE (metal response element), WUN motif (wound-responsive elements). En celeste se puede observar la secuencia correspondiente al extremo 5'-UTR (anotada en Phytozome 13).

Observamos que en la región promotora de CV1 se identificaron al menos 10 tipos diferentes de potenciales elementos en *cis* de respuesta a diversos factores de transcripción. Todos ellos han sido identificados con roles, en mayor o menor medida, en la regulación de la respuesta de plantas a estrés abiótico. Algunos de ellos como los MYC, GATA o los MYB son de respuesta al fotoperíodo, a bajas temperaturas, deshidratación, o alta salinidad. Sin embargo, otros como los TPC o los AP2 están también involucrados en vías de desarrollo y/o crecimiento moduladas por fitohormonas como auxinas o citoquinas (Song et al., 2024; Aksoy et al., 2023; Chen et al., 2022; Ma et al., 2024; Viola et al., 2023).

Particularmente, uno de los elementos en *cis* identificados en el promotor de CV1, que está presente en varias copias, son los elementos de respuesta a factores de transcripción NAC: NAM (*no apical meristem*), ATAF1/2 y CUC2 (*cup-shaped cotyledon*). El análisis resultó en 4 posibles elementos de respuesta a esta familia de factores: uno a -67 pb de secuencia AAGTCAAGA, otro a -635 de secuencia ATAAGTAAT, otro a -840 de secuencia TTTTGACCC, y uno a -1292 de secuencia TTTTGACTT.

Estos hallazgos junto con los descritos por Kamranfar (2018), donde se vió que *AtRD26* modulaba la actividad del promotor de *AtCV*, respaldan la idea de una posible participación de los factores de transcripción de la familia NAC en la regulación de la actividad del promotor de *GmCV1*.

En la Figura 3 se observa el perfil de co-expresión de otros genes de soja con *CV1*. Observamos que algunos de ellos corresponden a factores de transcripción de las familias identificadas en el promotor de *CV1*. Concretamente, el gen que presenta perfil de expresión muy similar a *CV1* en raíces es *Glyma.06G248900*, un factor de transcripción de la familia NAC. Observamos un alto grado de co-expresión de otro tipo de factores de transcripción como *Glyma.05G063600* o *Glyma.14G020100*, ambos de la familia de AP2. También *Glyma.10G010300*, un factor de transcripción de la familia MYB que presenta un alto grado de co-expresión con *CV1*. Además de moduladores de la transcripción, se identifican proteínas con otras funciones como *Glyma.06G267000* (una proteína relacionada con procesos de autofagia), *Glyma.06G319300* (proteína inhibidora de pectinoestrasas/metilasas), transportadores como *Glyma.10G112000* (transportador de cobre) o *Glyma.02G253200* (transportador de prolina), o reguladores de la transcripción como *Glyma.10G258600*.

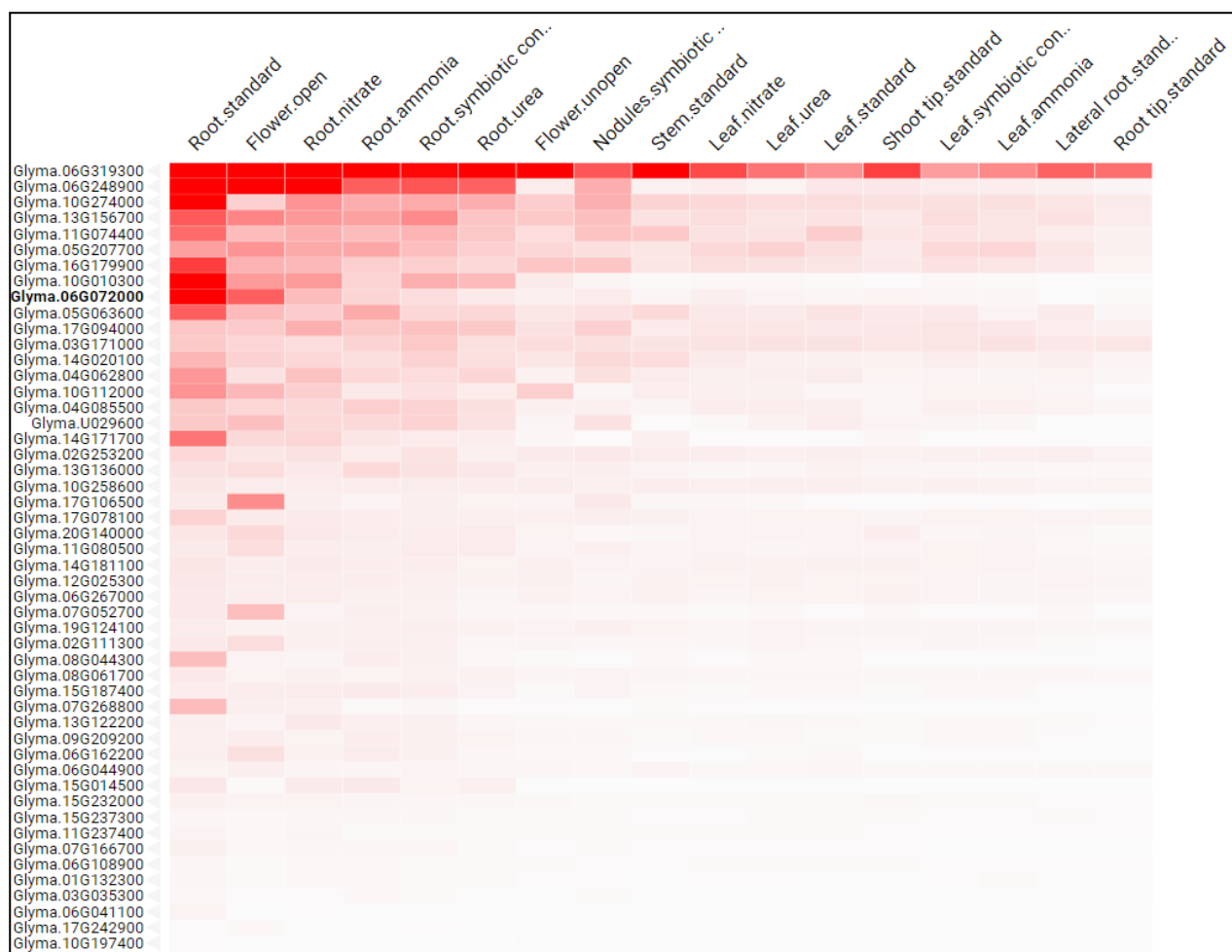


Figura 3. Matriz de co-expresión de CV1 (*Glyma.06G072000*) en soja. Se observa la co-expresión relativa de CV1 con otros genes en diferentes órganos y/o condiciones. Rojo más intenso indica mayor nivel de co-expresión. Matriz extraída de Phytozome 13, empleando datos del grupo experimental GeneAtlas v1 Tissue Sample FPKM.

Análisis *in silico* de la expresión de los genes *GmRD26* y *GmORE1*

Con el objetivo de aislar la secuencia codificante de los posibles genes de soja ortólogos a *RD26* y *ORE1* de *Arabidopsis*, se realizó la búsqueda de genes con homología de secuencia a nivel de aminoácidos con los genes de *Arabidopsis*. La búsqueda de secuencias homólogas se realizó mediante BLASTP en la base de datos Phytozome 13. La proteína producto del gen *Glyma.06G248900* (*GmRD26*), presentó 71% de identidad y 80% de similitud al producto del gen *At4g27410* (*AtRD26*), mientras que el producto de *Glyma.05G025500* (*GmORE1*) mostró 47% de identidad y 60% de similitud al de *At3g29035* (*AtORE1*). Dichas proteínas fueron las que mostraron el mayor nivel de homología de secuencia con las de *Arabidopsis*, y por lo tanto fueron seleccionadas para su estudio en el marco del presente trabajo.

Para el clonado de las secuencias codificantes de los dos NAC seleccionados, fue necesario conocer bajo qué condiciones se expresan estos genes. La estrategia seguida implicó analizar *in silico*, qué tejido y bajo qué condiciones los factores NAC de interés se expresan más, y a partir de los mismos realizar una purificación de RNAs totales. Luego, con esta muestra sintetizar DNA copia (cDNA) y amplificar las secuencias por PCR a tiempo final.

Para conocer en qué condiciones y órganos de la planta se da la mayor expresión, se utilizó la base de datos BAR ePlant (Waese et al., 2017). Los resultados de la búsqueda para los 2 factores en estudio se pueden visualizar en la Figura 4.

A partir de los mismos, se puede observar que la mayor acumulación de transcritos de *GmRD26* se da en flores, mientras que de *GmORE1* si bien ocurre en mayor medida en pelos radiculares, también se expresa en niveles relativamente altos en flores. Además, se contrastaron estos datos con papers de transcriptómica como el de Xuan et al. (2022) donde se observó que en plantas de soja resistentes a la sequía, la expresión de *GmRD26* incrementó 6,3 veces en comparación con la planta no tratada. En el caso de *GmORE1*, Le et al. (2012) registran que el gen presenta una inducción de la expresión de 1,3 veces en condiciones de estrés hídrico.

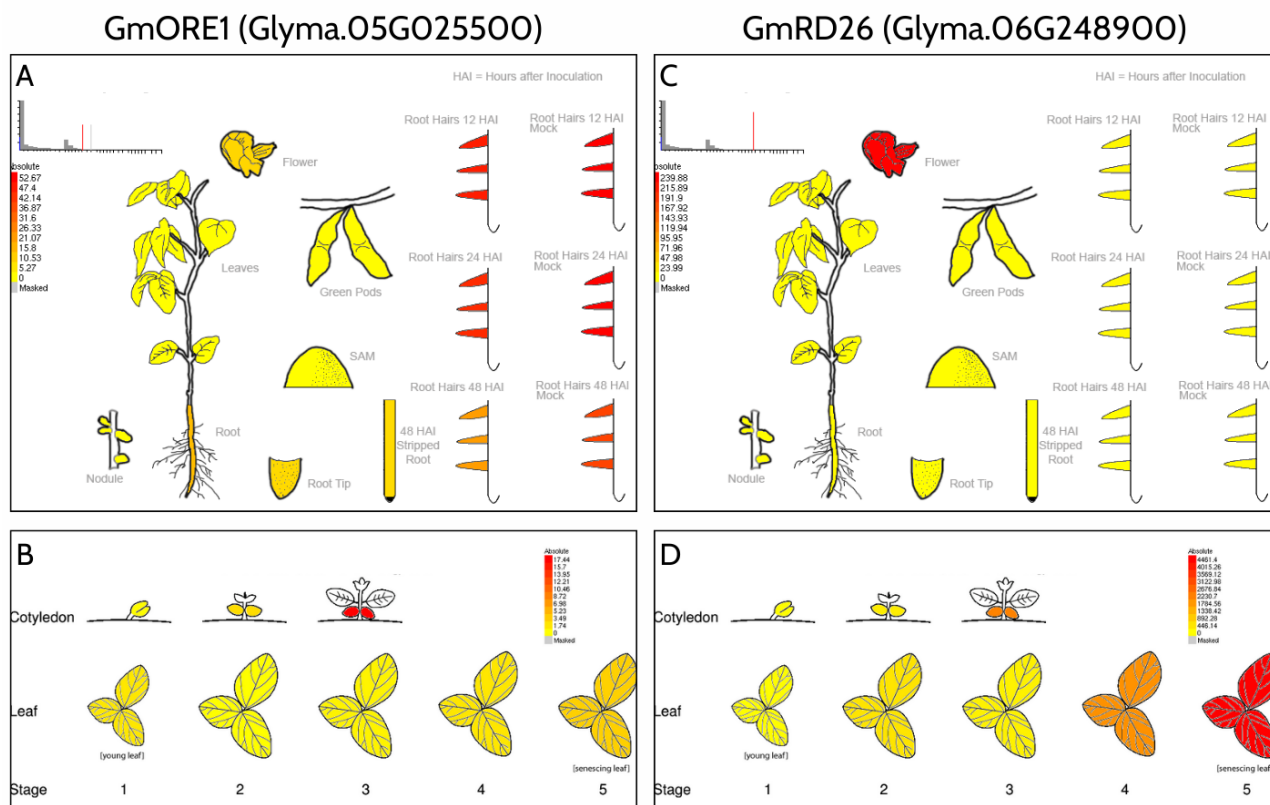


Figura 4. (A) Niveles de expresión relativo de *GmORE1* en diferentes órganos de soja en condiciones naturales. (B) Niveles de expresión relativo de *GmORE1* en diferentes estadios de soja sometida a tratamiento por déficit hídrico. (C) Niveles de expresión relativo de *GmRD26* en diferentes órganos de soja en condiciones naturales. (D) Niveles de expresión relativo de *GmRD26* en diferentes estadios de soja sometida a tratamiento por déficit hídrico. Estas imágenes están adaptadas de la original, y fueron generadas usando Plant eFP en bar.utoronto.ca/eplant por Waese et al. (2017).

Optimización de las condiciones de amplificación por PCR para genes de factores de transcripción NAC

Teniendo en cuenta los perfiles de expresión de los factores de transcripción *GmRD26* y *GmORE1*, se optó por extraer RNA total de flores senescentes. El RNA extraído fue utilizado para realizar síntesis de DNA copia (cDNA). Se optó por esta estrategia y no por la amplificación directa a partir de DNA genómico, debido a que ambos genes presentan intrones en su secuencia codificante (Figura 5A). Realizarlo de esta manera permitió obtener sólo la secuencia codificante de los factores. Empleando como molde el cDNA sintetizado, se realizó una amplificación por PCR a tiempo final de *GmORE1* y *GmRD26* empleando los protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos.

Para la amplificación de *GmRD26* se utilizaron primers FwRD26-*KpnI* y RvRD26-*XhoI*, permitiendo la obtención de la región codificante (CDS) flanqueada por los sitios de restricción *KpnI* y *XhoI*. El fragmento esperado para *GmRD26* era de 1033 pb.

Como se observa en la Figura 5B la banda de alta intensidad en el carril 1 se encuentra muy próxima, por debajo, a la banda de 1093 pb del marcador de peso molecular (marcador λ -*Pst*I).

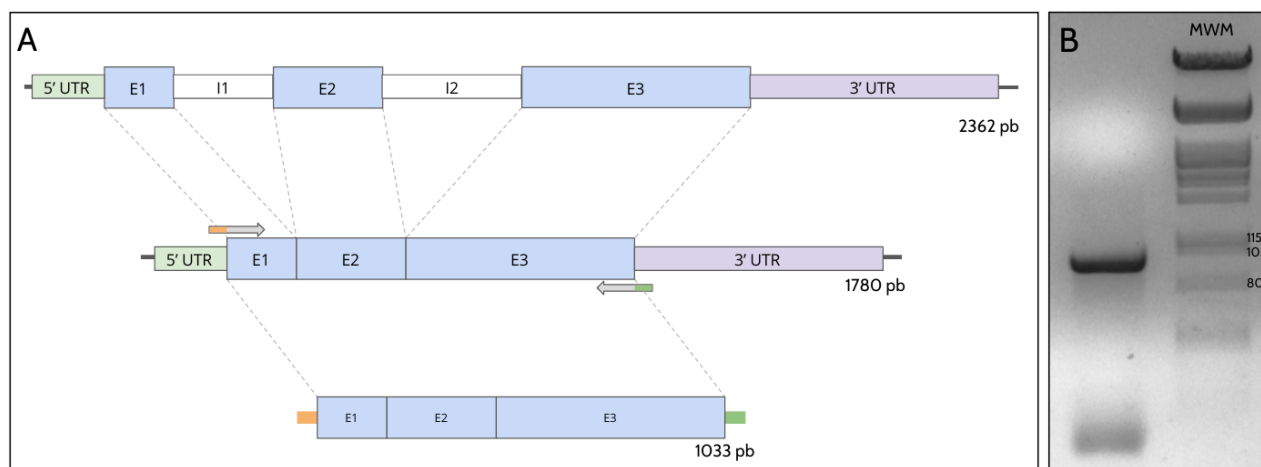


Figura 5. (A) Diagrama del gen *GmRD26* y el procesamiento del transcrito del mismo. Se señalan con flechas el sitio de hibridación de los primers, así como un extremo protruyente que simboliza la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción. En naranja la secuencia de *Kpn*I (GGTACC) y en verde la secuencia de *Xho*I (CTCGAG). Al final de la amplificación se debería obtener un fragmento de DNA con la secuencia codificante (sin intrones) del gen, con el agregado de un sitio de restricción en cada extremo. **(B)** Resultado de la amplificación por PCR a tiempo final del gen *GmRD26* realizado a partir de cDNA de soja en condiciones de estrés hídrico. En el carril 1 se observa una banda de alta intensidad a la altura de ~1000 pb.

En una primera instancia, para la amplificación de *GmORE1*, se intentó realizar un protocolo de amplificación similar que para *GmRD26*, pero no se logró determinar las condiciones apropiadas de amplificación en un sólo paso y empleando la misma polimerasa que en el caso anterior. Por lo tanto, se optó por realizar una PCR anidada, es decir, un protocolo en dos pasos donde se llevó a cabo una reacción primaria donde se amplificó el factor desde sus extremos 3' y 5' UTR, y luego otra (empleando una dilución de esta primera amplificación como molde) amplificando sólo la región codificante (CDS), en este caso sí empleando los primers diseñados para amplificar dicha secuencia, los cuales añaden los sitios de restricción para *Kpn*I y *Not*I al extremo 5' del producto amplificado. Para la amplificación primaria (desde los extremos UTRs), se empleó una polimerasa más robusta, sensible y eficiente y se determinó la temperatura de hibridación de los *primers* mediante un PCR en gradiente (Figura 6B). En la misma se observó que la mejor temperatura de hibridación fue 49 °C. En la Figura 6C se observa el resultado del PCR de amplificación de la región codificante de *GmORE1*. El fragmento esperado de la amplificación secundaria era de 1074 pb, y en la Figura se observa una banda de mayor intensidad en el carril 2 que se encuentra muy próxima a la de 1159 pb del marcador de peso molecular.

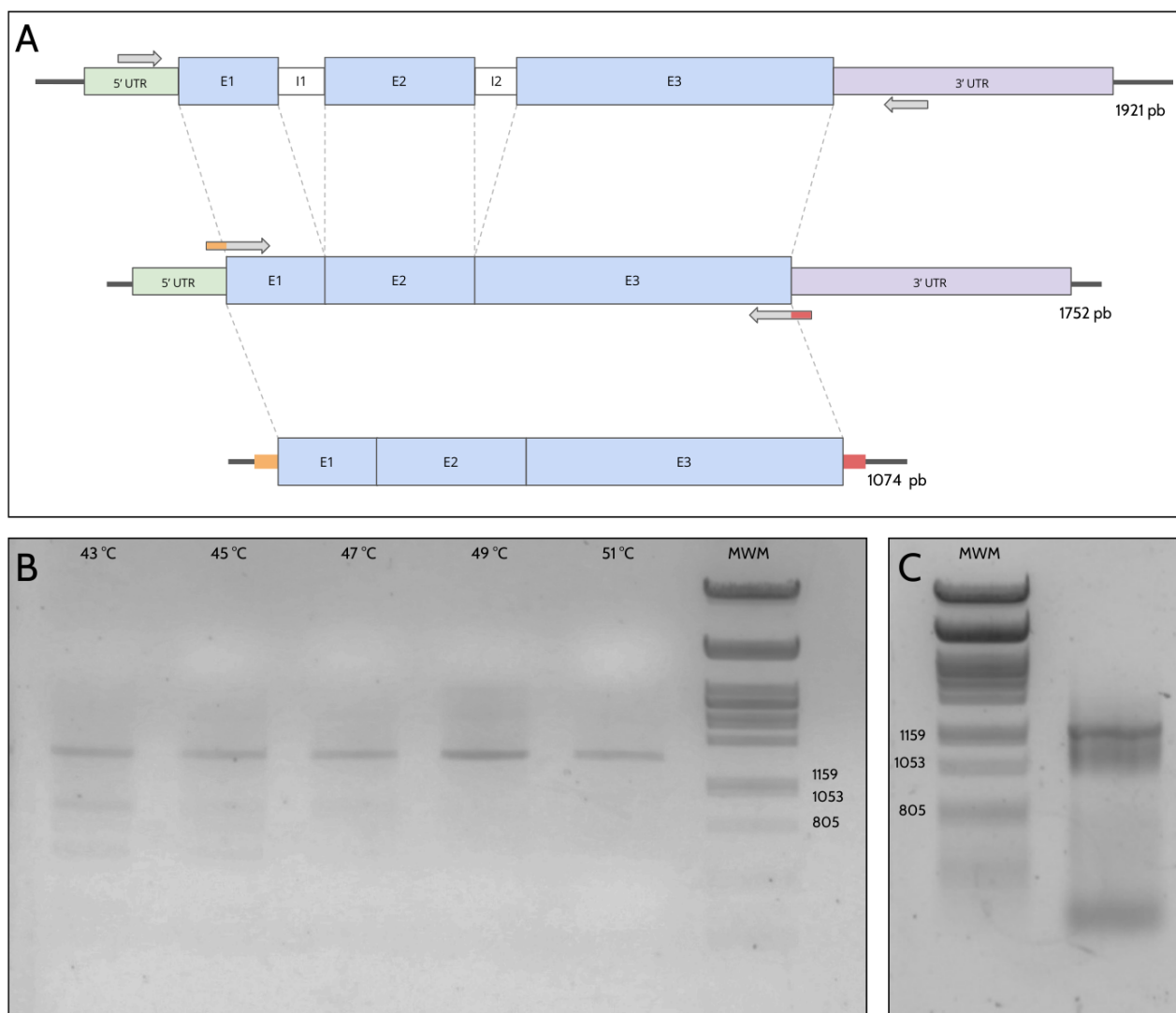


Figura 6. (A) Diagrama del gen *GmORE1* y el procesamiento del transcrito del mismo. Se señalan con flechas el sitio de hibridación de los primers, así como un extremo protruyente que simboliza la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción. En naranja la secuencia de *KpnI* (GGTACC) y en rojo la secuencia de *NotI* (GCGGCCGC). Al final de la amplificación se debería obtener un fragmento de DNA con la secuencia codificante (sin intrones) del gen, con el agregado de un sitio de restricción en cada extremo. **(B)** Resultado de amplificación por PCR a tiempo final de *GmORE1* usando cDNA como molde, desde los extremos 3' y 5' UTR. Los primers empleados para la misma presentaban complementariedad perfecta con la secuencia que hibridan. Se realizó un gradiente de temperatura para determinar la temperatura de hibridación que resultaba en la mayor amplificación. En todos los casos se observa amplificación de una banda de ~1500 pb. **(C)** Amplificación por PCR a tiempo final de la secuencia codificante de *GmORE1* usando como molde una dilución del producto de amplificación del carril 4 de (B) (temperatura de hibridación de los cebadores 49 °C). En el carril 2 se observa una banda de alta intensidad a la altura de ~1159 pb.

Una vez que se obtuvieron los fragmentos de PCR, se digirieron los extremos de los mismos con *KpnI* y *XhoI* en el caso de *GmRD26*, y *KpnI* y *NotI* en el caso de *GmORE1*.

Clonado de genes mediante tecnología Gateway

Para la generación de los vectores de expresión se empleó el sistema de clonado mediante recombinación LR por Gateway. El mismo presenta como ventaja que la generación de vectores de expresión queda reducida a un sistema estandarizado, donde se emplea el mismo protocolo para generar estos vectores a partir de diferentes vectores de entrada. De esta forma, para el clonado de distintas secuencias codificantes para factores de la familia NAC en un vector de expresión, el paso limitante es el clonado de la secuencia en el vector de entrada, pero una vez esto es realizado de forma exitosa, el clonado al vector de destino, y por lo tanto la obtención del vector de expresión, presenta altísima eficiencia (Katzen, 2007).

Este sistema se basa en la explotación del mecanismo que emplea el fago λ para invadir el genoma de *Escherichia coli*. Tanto el vector de entrada como el de destino presentan sitios de recombinación, att-L1/2 y att-R1/2 respectivamente, entre los cuales ocurrirá la recombinación de secuencias por acción de una clonasa. Una característica a destacar del sistema, es que la reacción de clonado no es reversible. Al recombinarse el fragmento entre los sitios att-L en el vector de entrada, hacia la región flanqueada por los sitios att-R en el vector de destino, la secuencia resultante en los bordes ya no son att-L y att-R, sino que pasan a ser att-P y att-B. Esto permite que el clonado ocurra de forma unidireccional (Walhout et al., 2000; Katzen, 2007).

El vector de entrada elegido para llevar a cabo este trabajo fue pENTR2B (Figura 7) comercializado por Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). El mismo presenta los bordes att-L, entre los cuales se encuentra el gen *ccdB*, letal para *E. coli* (parte de un sistema toxina-antitoxina que interfiere a nivel de la DNA girasa de esta bacteria) (Bernard & Couturier, 1992). Además, en ese mismo segmento interno, se encuentran 2 sitios con múltiples secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción.

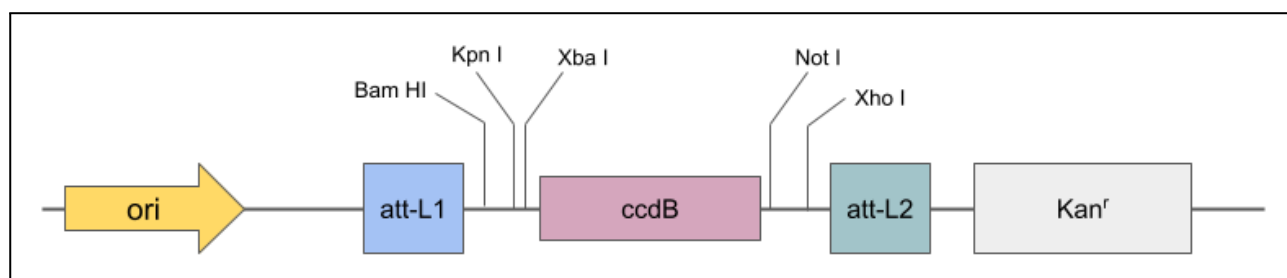


Figura 7. Diagrama del vector de entrada pENTR-2B. ori: origen de replicación, att-L1/2: sitios de recombinación, *ccdB*: cassette letal para *E. coli* TOP 10, Kan^r: resistencia a Kanamicina. Se marcan los sitios de restricción para las enzimas empleadas en el clonado.

El vector de destino empleado es el pMDC7 (Figura 8). Como se menciona en Materiales y Métodos, el mismo deriva de un vector anterior, pER8 diseñado por Zuo et al. (2000). El mismo presenta un cassette de expresión inducible por β -estradiol el cual funciona como se detalla a continuación. Un activador de transcripción quimérico, XVE, fue ensamblado mediante la fusión

del dominio de unión al ADN del represor LexA bacteriano (X), el dominio de transactivación de VP16 (V) y la región reguladora del receptor de estrógeno humano (E). La actividad de transactivación del factor quimérico XVE, cuya expresión es controlada por el promotor fuerte y constitutivo G10-90, queda estrictamente regulada por la presencia de β -estradiol (Zuo et al., 2000).

En estas condiciones, XVE activado por β -estradiol puede estimular la expresión del gen controlado por el promotor Olex A-46, que consiste en 8 copias del operador LexA fusionado upstream del promotor mínimo -46 35S.

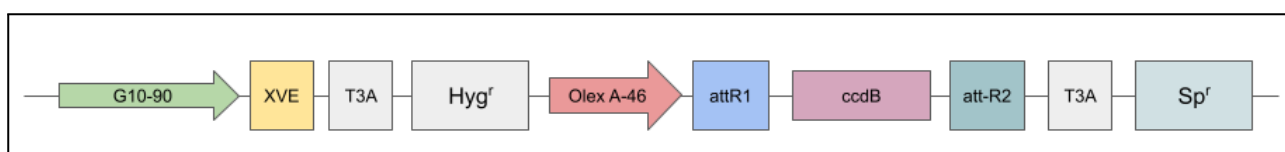


Figura 8. Diagrama lineal del vector de destino pMDC7. G10-90: promotor sintético constitutivo, gen quimérico XVE, Hyg^r: resistencia a higromicina, OlexA-46: promotor inducible conformado por 8 copias del operón LexA y la porción mínima -46 del promotor 35S, attR-1/2: sitios específicos para la recombinación, ccdB: cassette letal, Sp^r: resistencia a espectinomicina.

Los desarrolladores del vector original, indican que tras la inducción por β -estradiol, los niveles de expresión génica pueden ser hasta 8 veces mayores que los obtenidos a partir del promotor CaMV 35S (Zuo et al., 2000).

Para este trabajo, las ventajas del uso de este vector están en poder inducir de forma puntual y selectiva, en plantas de *Arabidopsis* con la construcción, altos niveles de expresión de los factores NAC estudiados, por agregado de β -estradiol.

Generación de vector de entrada con GmRD26

Para el clonado de *GmRD26* en el vector de entrada (pENTR2B), se digirió tanto el vector como el amplicón con las enzimas *KpnI* y *XhoI*. El vector fue además desfosforilado para prevenir autoligación (aún habiendo empleado enzimas que generan extremos no compatibles para ser re-ligados). Posteriormente, se realizó la reacción de ligación ON a 24 °C, con proporciones vector-inserto de 1:3. La mezcla de ligación fue transformada en células *E. coli* Top10 las cuales fueron posteriormente recuperadas y plaqueadas en LB con selección. Las placas fueron incubadas ON a 37 °C.

Una vez que se verificó crecimiento de los clones, se seleccionaron 10 transformantes para realizar ensayos de verificación de la presencia del plásmido. En la Figura 9A podemos observar los resultados del PCR de colonia realizado con dichos clones, amplificando el gen *GmRD26* (como control positivo se empleó el fragmento amplificado por PCR a 1 ng/ μ L). A partir de las colonias que dieron positivo mediante PCR de colonia (amplificación de *GmRD26*), se realizó una extracción de ADN plasmídico y el análisis del patrón de restricción con la enzima *BamHI*. Se

esperaba que el plásmido con el inserto, presentara un tamaño de 3311 pb (sin cassette *ccdB* y con el inserto). En la Figura 9B se observan los resultados del ensayo, empleando la enzima de restricción *Bam*HI. La misma presenta un sitio de corte (GGATCC) tanto en el vector como dentro del inserto, resultando en la liberación de un fragmento de 715 pb. En la Figura 9D se encuentra el mapa lineal del vector de entrada clonado con los sitios de restricción del ensayo marcados. Una vez se verificó la liberación de un fragmento de tamaño esperado, se envió secuenciar el plásmido verificado por digestión. En la Figura 9C se presenta el alineamiento de la secuencia recibida con la secuencia codificante de *GmRD26*. Como se puede observar, la misma coincide perfectamente con la secuencia reportada del transcrito procesado.

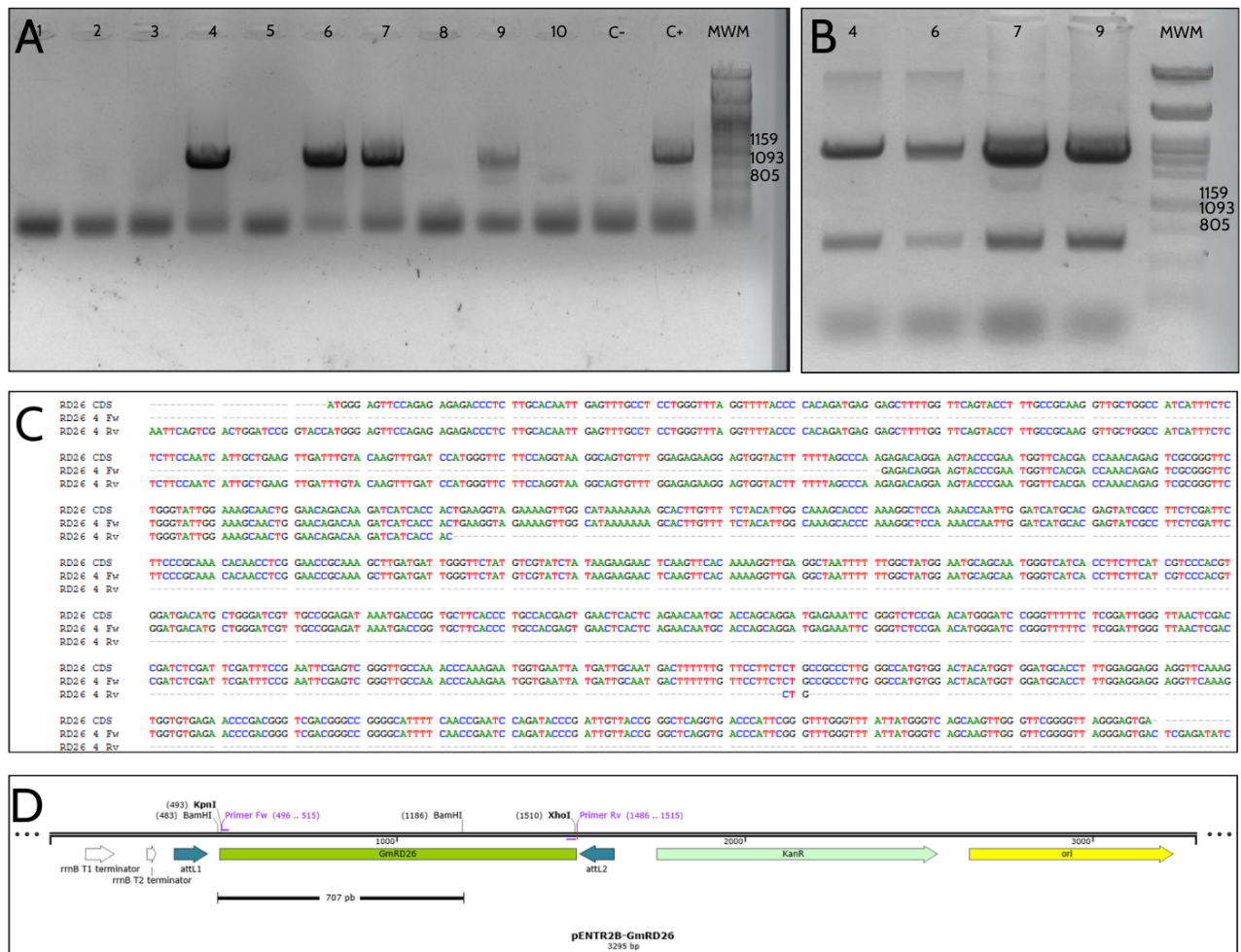


Figura 9. (A) Resultado de amplificación por PCR a tiempo final de *GmRD26* a partir de 10 clones seleccionados de la placa de transformación de *E. coli* con la mezcla de ligación de pENTR2B y *GmRD26*. Para los clones 4, 6, 7 y 9, así como para el control positivo, se observa amplificación de una banda de ~1000 pb. Como control positivo se empleó una dilución del producto de PCR de *GmRD26* y como control negativo se usó pENTR2B a 1 ng/μL. **(B)** Ensayo de digestión con *Bam*HI del plásmido extraído de los clones 4, 6, 7 y 9. En los cuatro se observa liberación de un fragmento de ~700 pb. **(C)** Alineamiento de secuencias de pENTR2B-GmRD26 obtenidas por secuenciación contra la secuencia codificante de *GmRD26* de referencia. La secuencia superior corresponde a la de referencia, la del medio a la de secuenciación con el primer directo y la de abajo a la de secuenciación con el primer reverso. **(D)** Mapa lineal del vector pENTR2B

clonado con la secuencia codificante de *GmRD26*. En el mapa se observan tanto el sitio de corte para la enzima de restricción *Bam*HI, como el fragmento que se libera producto de dicha digestión.

Clonado de *GmORE1* en el vector de entrada

En la Figura 10D se observa un gel de agarosa donde se corrió un poco del producto de amplificación de *GmORE1*. En la misma vemos una banda intensa de ~1100 pb (esperábamos una banda de 1074 pb). Así mismo, también se pueden observar otras bandas de tamaño similar más tenues. Con conocimiento de esto, tanto el vector de entrada como el inserto fueron digeridos con las enzimas *Not*I y *Kpn*I. Posteriormente, se desfosforiló el vector linealizado y se realizó la reacción de ligación con el inserto en proporción 1:3. La mezcla de ligación, se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* Top10 y se dejaron crecer ON.

Para proceder se optó por seguir una estrategia distinta a la empleada para la generación del vector de entrada de *GmRD26*¹. El nuevo enfoque consistió en aislar la mayor cantidad de clones posibles y verificar la presencia del inserto de tamaño esperado. Para ello se realizó un ensayo de digestión con *Xba*I y *Nco*I, y en la Figura 10E se encuentra el mapa lineal del vector de entrada clonado con los sitios de restricción del ensayo marcados.

En la Figura 10A y 10B se presenta el PCR de colonia realizado a partir de 22 clones aislados de la transformación de la mezcla de ligación, donde se buscó amplificar *GmORE1*. Se evidencia que de los 22, 18 amplificaron un fragmento de tamaño esperado (~1074 pb). Se procedió con el ensayo de digestión para los clones 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8 y en la Figura 10C se observan los resultados del mismo. Se seleccionó el clon 2 y se envió a secuenciar el plásmido por presentar el patrón de restricción esperado para el clonado de la secuencia codificante del gen.

¹ En la sección Anexo, se describe bajo el título de “Primeros pasos de clonado de *GmORE1* en pENTR2B” la aplicación de dicha estrategia para intentar clonar el gen en el plásmido de entrada.

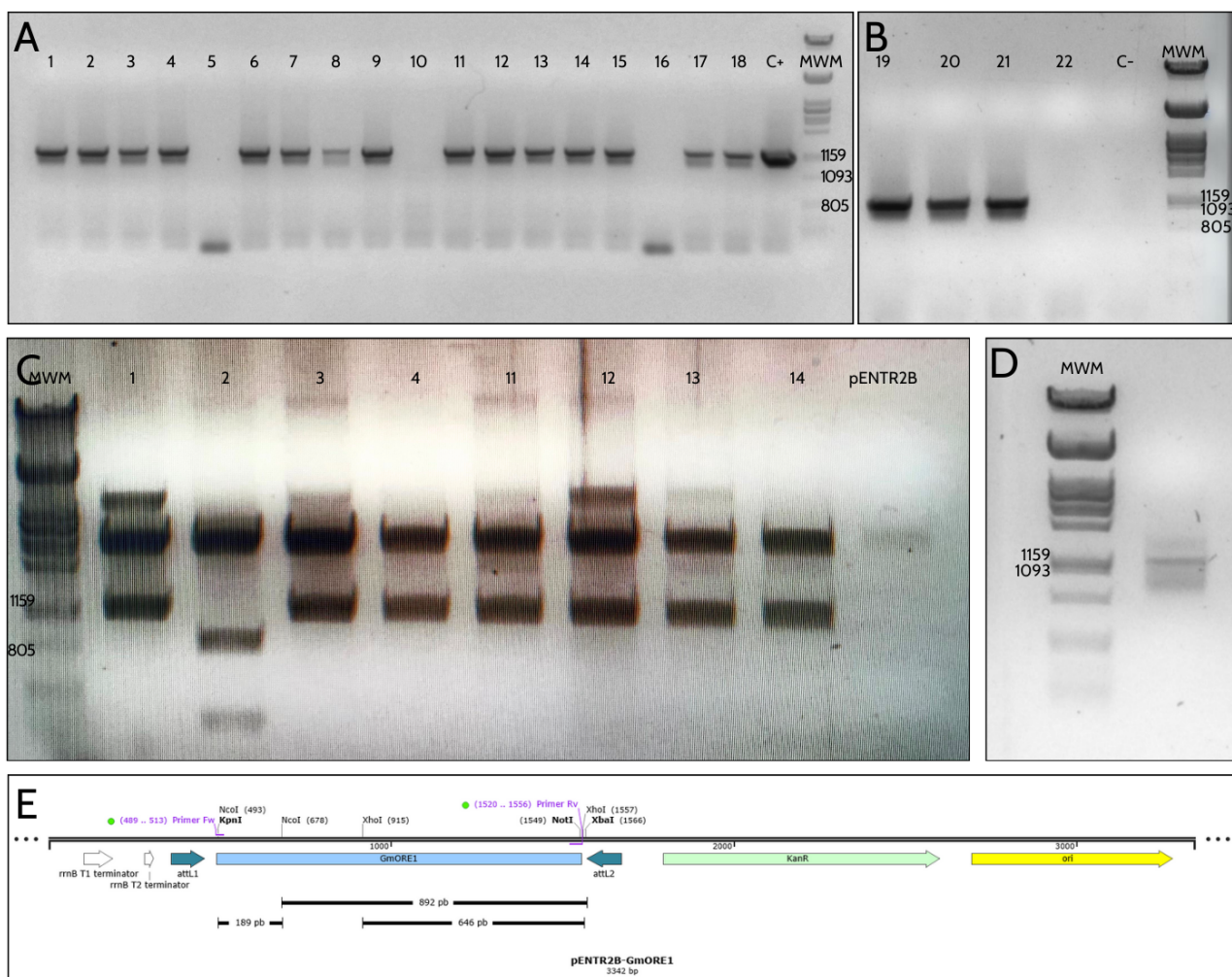


Figura 10. (A) y (B) Amplificación por PCR a tiempo final de GmORE1 a partir de 22 clones seleccionados de la placa de transformación de *E. coli* con la mezcla de ligación de pENTR2B y GmORE1. Se observa que en 18 clones, así como el control positivo, se observa amplificación de una banda de ~1200 pb. Como control positivo se empleó una dilución del producto de PCR de GmORE1 y como control negativo se usó pENTR2B a 1 ng/μL. **(C)** Ensayo de digestión con *XbaI* y *NcoI* de plásmidos extraídos de los clones 1, 2, 3, 4, 11, 12, 13 y 14. En la digestión del plásmido del clon 2, se observa la liberación de una banda de ~800 pb y otra de ~200 pb, mientras que en las otras se observa una banda de ~1200 pb y otra de ~2400 pb. **(D)** Amplificación por PCR a tiempo final de *GmORE1* a partir de cDNA. **(E)** Mapa lineal del vector pENTR2B clonado con la secuencia codificante de *GmORE1*. En el mapa se observan tanto el sitio de corte para la enzima de restricción *XbaI* y *NcoI*, como el fragmento que se libera producto de dicha digestión.

Generación del vector binario de expresión condicional de GmRD26

Se procedió a realizar la reacción de clonado LR de pENTR2B-GmRD26 con el plásmido de destino pMDC7 y a transformar células electrocompetentes de *E. coli* Top10 con la mezcla de recombinación. Las mismas fueron incubadas ON y una vez que se verificó crecimiento en la placa se aislaron 8 clones y se realizó un PCR de colonia para amplificar *GmRD26* a partir de los mismos. En la Figura 11A se muestran los resultados de la amplificación (carriles 4-11), junto con un control positivo y uno negativo (carriles 2 y 3 respectivamente). Posteriormente, se realizó una

extracción de plásmido de dichos clones y se realizó un ensayo de digestión empleando la enzima *KpnI*. La misma presenta dos sitios de corte (GGTACC) en el vector (a 172 pb uno del otro) y en uno de los extremos del inserto, por lo que se esperaba un fragmento de 1580 pb, uno de 172 pb y otro de ~11000 pb. En la Figura 11D se presenta el mapa lineal del plásmido de destino clonado con *GmRD26*, con los sitios de restricción marcados y el fragmento de mayor tamaño que se libera producto de esta digestión.

Una vez se verificó la liberación de un fragmento de tamaño esperado (Figura 11B), se envió a secuenciar dos clones positivos. En la Figura 11C se presenta el alineamiento de las secuencias recibidas con la secuencia del transcrito procesado de *GmRD26*. Como se puede observar y como era de esperar, las mismas coinciden perfectamente con la secuencia reportada.

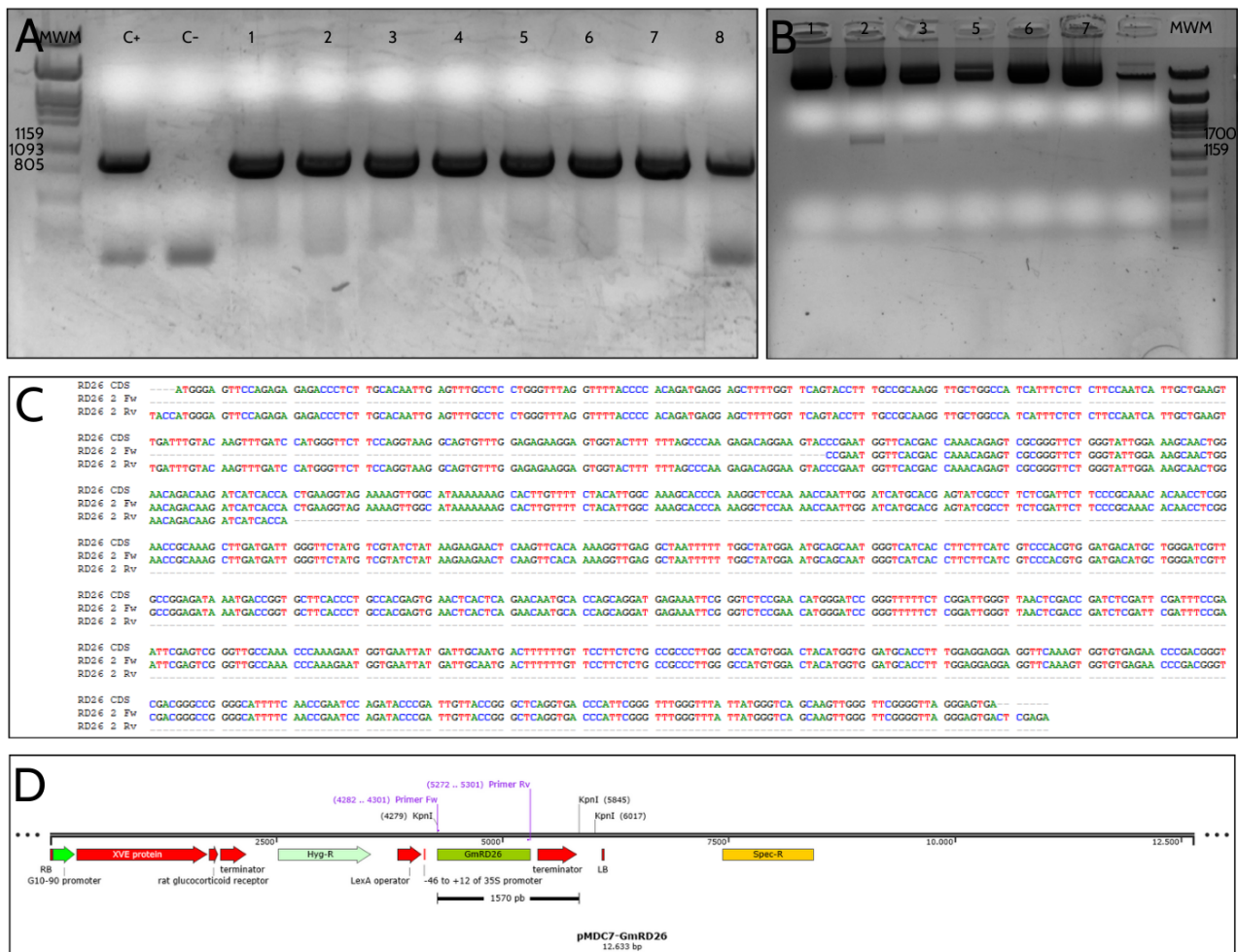


Figura 11. (A) Resultado de amplificación por PCR a tiempo final de *GmRD26* a partir de 8 clones seleccionados de la placa de transformación de *E. coli* con la mezcla de recombinación de pMDC7 y pENTR2B-*GmRD26*. Para todos los clones analizados, así como para el control positivo, se observa amplificación de una banda de ~1000 pb. Como control positivo se empleó una dilución del producto de PCR de *GmRD26* y como control negativo se usó pENTR2B a 1 ng/μL. **(B)** Ensayo de digestión con *KpnI* del plásmido extraído de los clones 1, 2, 3, 5, 6 y 7. En los clones 2, 3, 5 y 6 se observa la liberación de un fragmento de ~1600 pb. **(C)** Alineamiento de secuencias de pMDC7-*GmRD26* obtenidas por secuenciación contra la secuencia codificante de *GmRD26* de referencia. La secuencia superior corresponde a la de referencia, la del medio a la de secuenciación con el primer directo del plásmido extraído del clon 2 y la de abajo a la de

secuenciación con el primer reverso del mismo plásmido. **(D)** Mapa lineal del vector de destino pMDC7 clonado con la secuencia codificante de *GmRD26* vía recombinación LR. Tanto los sitios de corte para la enzima *KpnI* como el fragmento de mayor tamaño que se libera producto de la digestión con la misma, se muestran señalados en la figura.

Una vez verificada la secuencia del inserto en el vector pENTR2B, se transformaron células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58c1 mediante electroporación del plásmido extraído del clon 2, y se incubaron en condiciones adecuadas durante 48-72 h. Una vez se verificó crecimiento en la placa se seleccionaron 8 clones resistentes al medio selectivo (espectinomicina), y se realizó un PCR de colonia para amplificar *GmRD26* y así verificar la presencia del vector de expresión (Figura 12). Se esperaba la amplificación de un fragmento de 1033 pb el cual se constató en los resultados. Finalmente, a partir de un cultivo líquido se preparó un cultivo con glicerol para conservar la cepa a -86 °C hasta su posterior utilización.

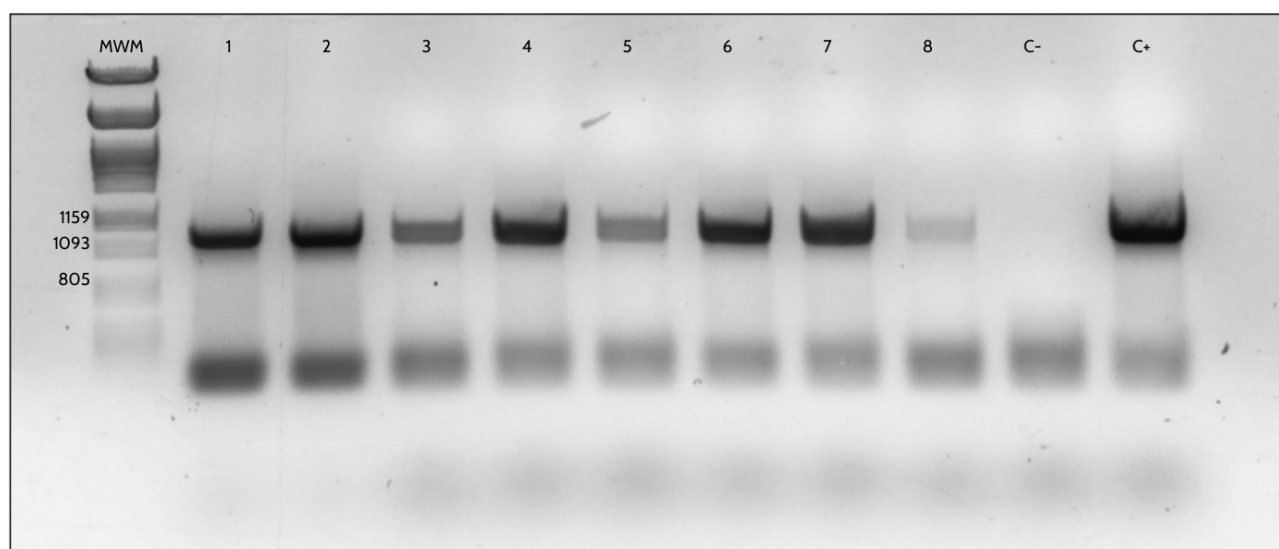


Figura 12. Resultado de amplificación por PCR a tiempo final de *GmRD26* a partir de 8 clones seleccionados de la placa de transformación de *A. tumefaciens* transformadas con de pMDC7-*GmRD26*. Para todos los clones analizados, así como para el control positivo, se observa amplificación de una banda de ~1100 pb.

Generación del vector binario para la expresión condicional de *GmORE1*

Al igual que con *GmRD26*, el clon seleccionado de pENTR2B-*GmORE1* fue subclonado en pMDC7 mediante un paso de recombinación LR. Se transformaron células *E. coli* electrocompetentes con la mezcla de recombinación y se plaqueó en un medio con selección (espectinomicina) para el vector de destino pMDC7. Se aislaron 8 clones y se realizó un PCR de colonia para amplificar la secuencia codificante de *GmORE1*. En la Figura 13A se muestra el resultado de la amplificación. Se realizó extracción de plásmido a partir de los mismos 8 clones y se realizó un ensayo de digestión con la enzima *KpnI*. La misma presenta un sitio de corte (GGTACC), por lo tanto se esperaba un fragmento de ~1660 pb y otro de ~11000 pb. Los resultados del ensayo de digestión se presentan en la Figura 13B. En la Figura 13D se presenta el

mapa lineal del plásmido de destino clonado con *GmORE1*, con los sitios de restricción marcados y el fragmento de mayor tamaño que se libera producto de esta digestión. Se envió a secuenciar el plásmido del clon 7 y la secuencia recibida del vector fue alineada con la secuencia codificante con intrones (genómica). En la Figura 13C se observa el alineamiento, donde se constata que se clonó la secuencia genómica con intrones y no la secuencia de cDNA.

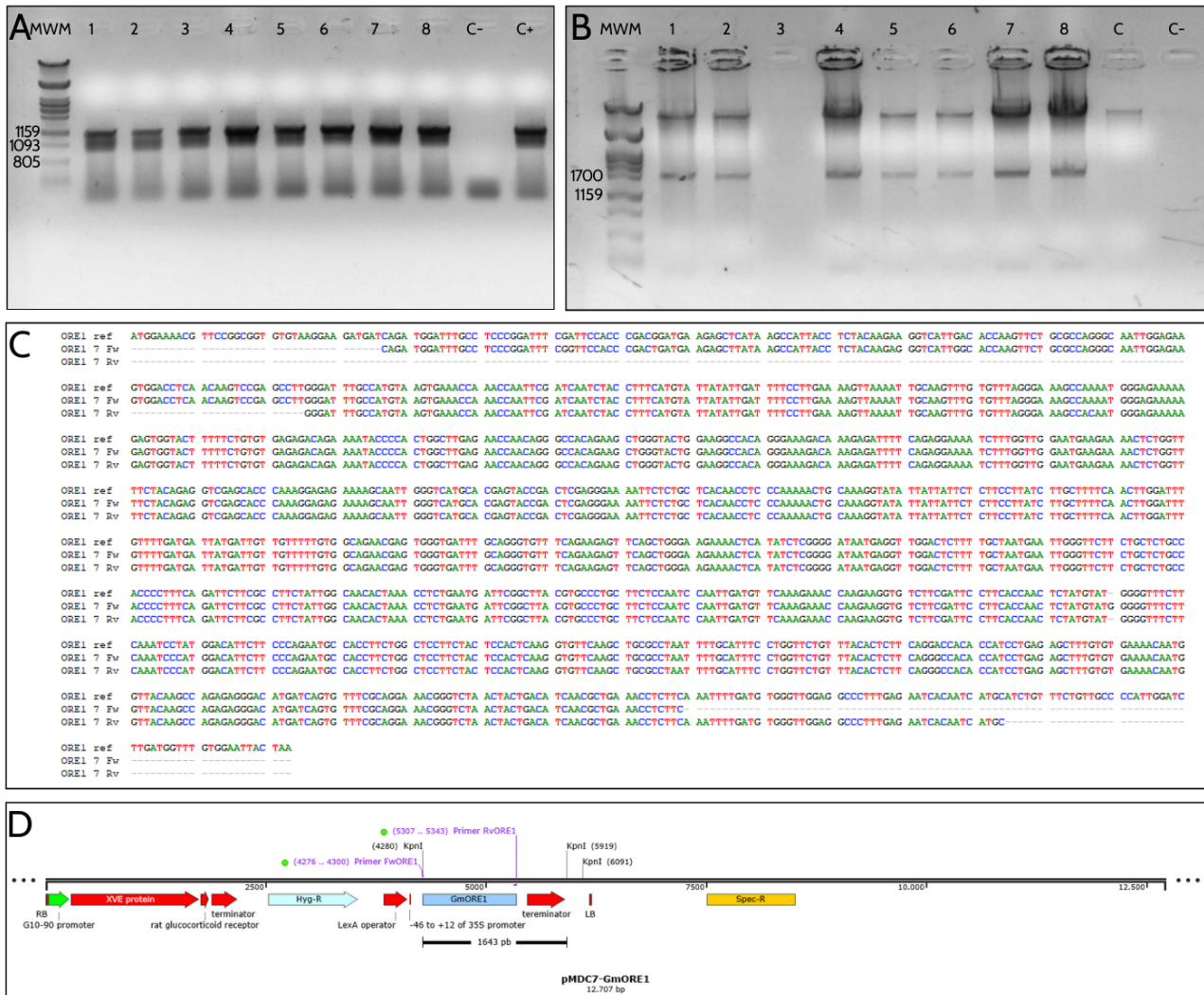


Figura 13. (A) Resultado de amplificación por PCR a tiempo final de *GmORE1* a partir de 8 clones seleccionados de la placa de transformación de *E. coli* con la mezcla de recombinación de pMDC7 y pENTR2B-*GmORE1*. Para todos los clones analizados, así como para el control positivo, se observa amplificación de una banda de ~1100 pb. **(B)** Ensayo de digestión con *KpnI* del plásmido extraído de los ocho clones seleccionados. En las digestiones de los plásmidos extraídos de los clones 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8 se observa la liberación de un fragmento de ~1700 pb. **(C)** Alineamiento de secuencias de pMDC7-*GmORE1* obtenidas por secuenciación contra la secuencia genómica (codificante con intrones) de *GmORE1* de referencia. La secuencia superior corresponde a la de referencia, la del medio a la de secuenciación con el primer directo del plásmido extraído del clon 2 y la de abajo a la de secuenciación con el primer reverso del mismo plásmido. **(D)** Mapa lineal del vector de destino pMDC7 clonado con la secuencia codificante de *GmORE1* vía recombinación LR. Tanto los sitios de corte para la enzima *KpnI* como el fragmento de mayor tamaño que se libera producto de la digestión con la misma, se muestran señalados en la figura.

A pesar de este resultado, se optó por proceder con la transformación de este vector. Se transformó el plásmido extraído del clon 7 en células de *Agrobacterium tumefaciens* C58c1 electrocompetentes las cuales se plaquearon en un medio con selección para el vector de destino. Pasadas 48-72 horas se observó crecimiento en la placa y se realizó un PCR de colonia para verificar la presencia de *GmORE1*. En la Figura 14 se observan los resultados del mismo.

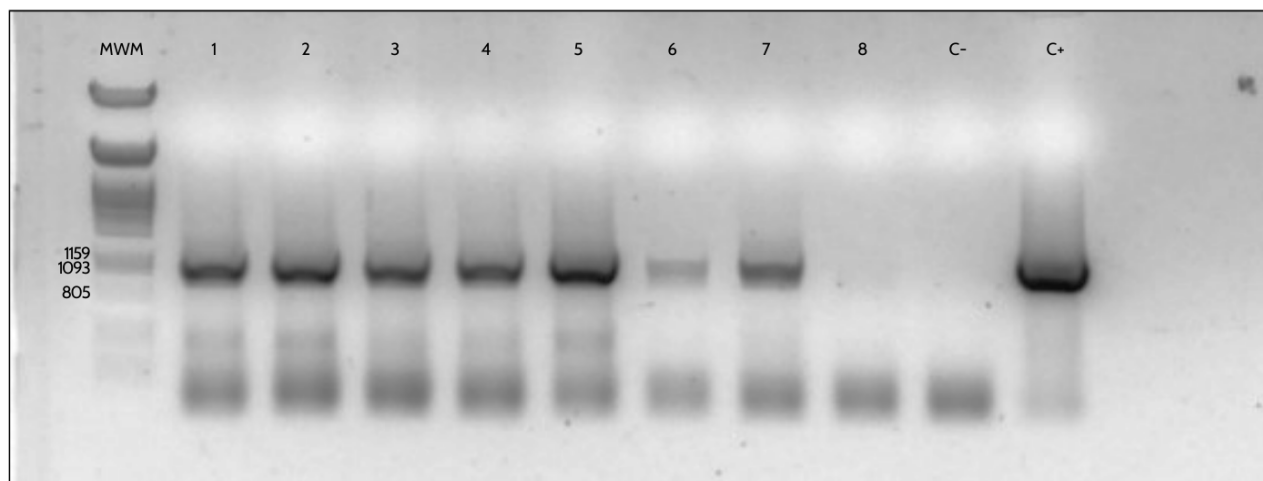


Figura 14. Resultado de amplificación por PCR a tiempo final de *GmORE1* a partir de 8 clones seleccionados de la placa de transformación de *A. tumefaciens* transformadas con de pMDC7-*GmORE1*. Para los clones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, así como para el control positivo, se observa amplificación de una banda de ~1100 pb.

Finalmente, a partir de un cultivo líquido se preparó un glicerol para conservar el clon 5 a -86 °C hasta su posterior utilización.

Transformación de Arabidopsis

Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* Col-0 de la línea transgénica proCV1:GUS para transformar con las construcciones generadas para expresión condicional de *GmRD26* o *GmORE1*. Para asegurar la presencia de la construcción génica, las semillas fueron germinadas *in vitro* en presencia de fosfotricina como medio selectivo, y luego transferidas a tierra. Las inflorescencias primarias se cortaron para promover un mayor crecimiento vegetativo (Figura 15A). Cuando se alcanzó un buen número de botones florales, se procedió a la transformación. Para ello, se crecieron precultivos líquidos de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones génicas generadas, así como un control de la bacteria con el vector de destino vacío (pMDC7 sin clonar), en medio YEP con selección. Luego, cada clon fue resuspendido en un tubo diferente con solución de infiltración. Para la transformación en sí, se siguió un protocolo similar al descrito por Clough & Bent (1998), sólo que en lugar de realizar inmersión floral en la solución de infiltración, se colocó una gota de la solución de infiltración en cada botón floral usando una pipeta (Figura 15C). Luego las plantas se dejaron cubiertas con una lámina de plástico durante 24 horas en el cuarto de cultivo. El procedimiento de transformación se realizó 4 veces por planta para aumentar

la eficiencia de transformación. Finalmente, se dejó que las plantas produjeran vainas con semillas y se cosecharon. En la Figura 15 se presentan algunas imágenes del proceso.



Figura 15. Fotografías de la transformación de *Arabidopsis thaliana* proCV1:GUS línea 31. **(A)** Inflorescencia primaria. **(B)** Planta joven con algunas inflorescencias. **(C)** Transformación empleando *Agrobacterium tumefaciens* como medio

para insertar el gen de interés en el genoma de la planta. **(D)** y **(E)** Fotos de vainas inmaduras tomadas semanas después de haber transformado las flores con *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción génica.

Identificación y caracterización molecular de líneas transgénicas

Se colectaron todas las semillas producidas por las plantas transformantes (casi 2 gramos en total para cada transformación). Una alícuota de aproximadamente 300 mg de semillas se esterilizó de forma superficial y se sembraron en placas de MS $\frac{1}{2}$ con higromicina y plant preservative mixture (ppm) como agentes de selección. Luego de la emergencia de las plántulas, se seleccionaron aquellas que presentaron un crecimiento destacado con respecto a las demás. Aproximadamente 30 plantas resistentes al medio selectivo, transformadas con la construcción para la expresión de *GmRD26*, fueron seleccionadas y trasplantadas por separado en almáciguas individuales. En la Figura 16 se presentan imágenes del procedimiento.

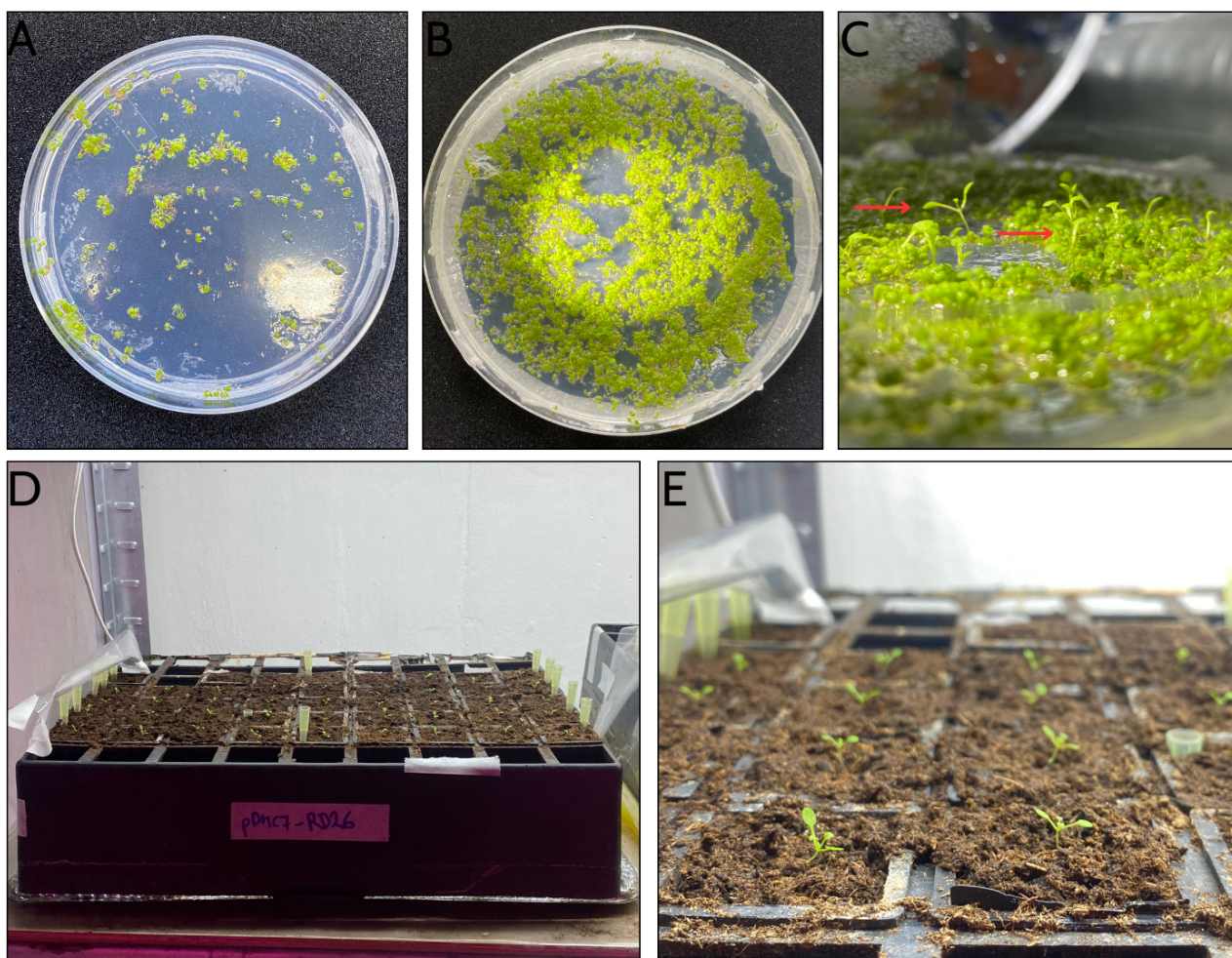


Figura 16. Fotografías del proceso de selección y trasplante de transformantes de *Arabidopsis thaliana* proCV1:GUS resistentes a medio con higromicina. **(A)**, **(B)** y **(C)** Imágenes del proceso de germinación de plántulas en medio con selección por Higromicina. Aquellas que presentan mejor crecimiento con respecto a las demás (señaladas con una flecha roja), podrían potencialmente haber incorporado la construcción génica. **(D)** y **(E)** Las plántulas seleccionadas fueron transferidas a almácigos separados para seguir su crecimiento y realizar caracterizaciones moleculares de forma individual.

La caracterización molecular fue realizada para las plantas transformadas con las construcciones pMDC7-GmRD26 y con el vector vacío ya que fue con las que se avanzó más rápidamente para su generación. Para verificar si dichas plántulas incorporaron la construcción, realizamos extracción de DNA genómico de un pequeño fragmento de hoja de cada planta. Se seleccionaron 10 líneas de cada transformación. En el caso de las plantas transformadas con la construcción pMDC7-GmRD26 se amplificó el gen *GmRD26* empleando los primers FwRD26-*KpnI* y RvRD26-*XhoI*. Se esperaba la amplificación de un fragmento de 1033 pb y en la Figura 17A se observa la amplificación de un fragmento de tamaño esperado, para 9 de las 10 líneas (la número 4 no presenta amplificación). Para las plantas transformadas con el vector vacío se amplificó el gen de higromicina (presente en el vector de expresión) por PCR a tiempo final y los resultados se muestran en la Figura 17B. Se esperaba un fragmento de 442 pb y observamos que en 9 de las 10 líneas seleccionadas un fragmento de tamaño esperado (la línea 9 no presenta amplificación).

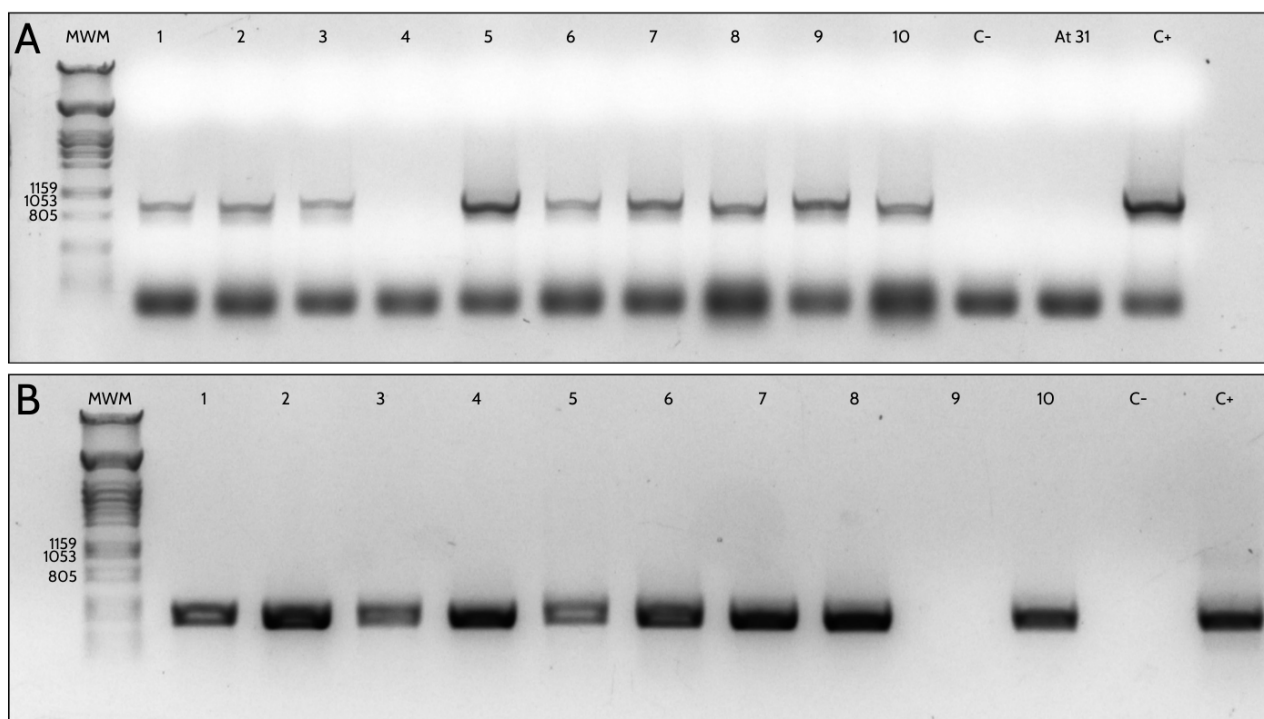


Figura 17. (A) PCR a tiempo final para amplificar *GmRD26* a partir de DNA genómico extraído de las 10 líneas seleccionadas de la transformación. Como control positivo se empleó pENTR2B-GmRD26 1 ng/μL y como control negativo se usó gDNA de *A. thaliana* Col-0. **(B)** PCR a tiempo final para amplificar el gen de resistencia a higromicina presente en el vector de destino a partir de DNA genómico extraído de las 10 líneas seleccionadas de la transformación. Como control positivo se empleó pMDC7 1 ng/μL y como control negativo se usó gDNA de *A. thaliana* Col-0.

Discusión

El proyecto en el cual se enmarca este trabajo, intenta desarrollar una estrategia para retrasar la senescencia inducida por estrés (estrechamente relacionada con un aumento en la expresión de CV1) al mismo tiempo que se mantiene inalterada la senescencia natural (más relacionada con la expresión de CV2). Los factores de la familia NAC presentan un rol importante en la regulación de la respuesta a estímulos de estrés abiótico (no exclusivamente) y su inducción ante estas condiciones ha sido demostrada anteriormente. Por lo tanto, consideramos que sería posible que estos factores tengan una relevancia importante en la modulación de vías de rescate de nutrientes como lo es la de CVV.

Varios estudios han intentado desarrollar estrategias de retraso de la senescencia por *knockout* o *knockdown* de diversos genes, dentro de los cuales se encuentran los genes *ATG*. En el caso de los mutantes afectados en procesos de autofagia, es común que presenten fenotipos de hipersensibilidad a la deficiencia de nutrientes y senescencia natural acelerada (resultando en el efecto contrario al esperado) (Qi et al., 2023). Incluso, se ha visto que algunos genes *ATG* en *Arabidopsis* participan con un rol activo en hacer frente a la senescencia. A modo de ejemplo, en Liu et al. (2009) se constató que aquellas plantas que presentaron el gen *AtATG18a* silenciado por iRNA, presentaron mayor sensibilidad al estrés hídrico y osmótico. Demostrando así el rol importante de este gen en la respuesta al estrés.

También se ha intentado este enfoque aplicado a la eliminación de otras rutas vesiculares independientes de autofagia, como la de *senescence associated vacuoles* por *knockout* de *AtSAG12*. En el caso de esta cisteín proteasa, parecería estar involucrada en la removilización de nitrógeno por lo que su silenciamiento como estrategia para reducir la senescencia no presenta un balance costo/beneficio positivo desde un punto de vista productivo (James et al., 2019).

Por otro lado, en el estudio publicado por Ahouvi et al. (2022) generaron un mutante knockout de CV en tomate (*Solanum lycopersicum*), y observaron un fenotipo de tolerancia al estrés hídrico sin haber detectado efectos negativos adversos, como un retraso en la senescencia natural o un compromiso en el rendimiento. Además, tanto el trabajo de Blumwald & Wang (2014) como el de Sade et al (2017) (mencionados en la introducción) dejan en claro que la sobreexpresión inducible de CV, tanto en arroz (*Os*) como en *Arabidopsis* (*At*), genera un fenotipo de senescencia acelerada, mientras que el silenciamiento de este gen retrasa la senescencia inducida por estrés abiótico. Estos resultados sugieren que la regulación negativa de CV podría, por un lado tener efectos positivos en el mantenimiento de la estabilidad de los cloroplastos, y por otro retrasaría la senescencia inducida por algunos factores abióticos (o visto desde otro ángulo, aumentar la resistencia al estrés abiótico) (Blumwald & Wang, 2014; Sade et al., 2017; Fleitas et al., 2023). En base a todo esto, se podría presumir que interrumpir la vía de degradación por CV1 en soja, podría ser una buena estrategia para retrasar la senescencia inducida por estrés, sin generar

otros efectos adversos no deseados. A nivel de la región promotora de este gen, se podrían generar modificaciones en los elementos en *cis*, y de esta forma se podría reducir la afinidad de los activadores de la transcripción.

Promotor de CV1 & CV2

Como fue analizado por Fleitas et al. (2023) y como se constató en el análisis *in silico* de este trabajo, la región promotora de los genes *GmCV1* y *GmCV2* están diferencialmente reguladas. Las secuencias promotoras de ambos genes presentan grandes diferencias, principalmente en la presencia y abundancia de diferentes elementos de respuesta en *cis*. Por mencionar algunos, en *proCV2* se identifican varios elementos CG-1, b-HLH, SEF1 & SEF4, que son menos abundantes o directamente están ausentes en *proCV1* (Fleitas et al., 2023). Por otro lado, en *proCV1* (ilustrado en la Figura 2) se encuentran con mayor abundancia sitios de unión para factores de transcripción de respuesta a auxinas, para factores GATA y SBP, ambos caracterizados con roles en el desarrollo y el crecimiento (Abdullah et al., 2018; Guo, Ren, et al., 2021). También se observan elementos de respuesta a factores MYB, para los cuales se han identificado roles en las vías de tolerancia al estrés hídrico disparadas por ácido abscísico, con participación en la modulación de movimientos estomáticos (Cominelli et al., 2005), como activador vías de respuesta a este tipo de estrés (Abe et al., 2002) y en el *crosstalk* de señales disparadas por ABA y auxinas (participando en la integración de ambas vías) (Seo et al., 2009). Por último, se hallaron múltiples sitios de respuesta a factores de transcripción NAC. Los mismos constituyen una familia enorme de factores de transcripción en plantas con participación en diversos procesos como respuesta a estrés biótico y abiótico (Nakashima et al., 2007; Shao et al., 2015) y cuyas implicancias se discuten más adelante.

La presencia de esta clase de elementos de respuesta, sugiere que la regulación de la expresión de CV1 estaría orientada hacia la respuesta a estímulos ambientales, particularmente abióticos.

Rol de los factores NAC

Ambos factores de la familia NAC objeto de estudio de este trabajo, fueron previamente caracterizados en *Arabidopsis*. Su posible ortólogo en soja fue identificado por homología de secuencias y a la fecha no hay trabajos que profundicen en la caracterización de dichos genes candidatos ni de la proteína para la que codifican en soja. De todas formas, es un acercamiento válido tratar reconocer los patrones identificados para estos moduladores de la transcripción en otras especies, tratando de establecer una similitud con lo que podría ocurrir en soja.

Un estudio que buscó identificar el gen ortólogo a *AtRD26* en soja también concluyó que *Glyma.06G248900* era un buen candidato. En el mismo, Freitas et al. (2019) evaluaron por RT-qPCR el perfil de expresión del mismo en plantas de soja sometidas a 3 tratamientos, PEG

(10% m/v), ácido abscísico (150 mM) y sequía. En todos los tratamientos se identificó una regulación positiva de la expresión del mismo, con un cambio de hasta 25 veces en la expresión a en hoja y 10 veces en raíz en condiciones de sequía luego de 12 horas de tratamiento. Además, de la misma forma que se observa en estudios en *Arabidopsis*, en soja también hay un aumento importante en la transcripción de este gen cuando la planta es tratada con ácido abscísico (Takasaki et al., 2015; Freitas et al., 2019). Esta inducción ante condiciones de estrés hídrico, podría estar relacionada con una participación de este factor NAC en la respuesta a este tipo de estrés y quizás en la vía de degradación cloroplástica por CVVs.

En *Arabidopsis*, el sitio de unión de *RD26* a *proAtCV* fue caracterizado y presenta una secuencia tipo: CTGr(n5-6)YACGyhayy para el primer sitio de unión, y rgwnDnY(n8-9)YACCGtmwcy para el segundo identificado (R = A o G, Y = C o T, M = A o C, W = A o T, H = A, C o T, V = A, C o G, D = A, G o T). Si bien ambas secuencias difieren bastante, los autores del trabajo plantean que las secuencias CGT y YACG parecerían ser críticas para que se de la unión (especialmente esta última que se encuentra en ambas secuencias) (Kamranfar et al., 2018). Si bien en *proCV1* de soja no se logró identificar una secuencia de unión igual a la descrita, si se localizó una secuencia similar a parte del segundo sitio de unión, RGWNDNYA, solapante con el sitio NAC en -67 pb del SIT y con la secuencia YACG 21 pb downstream del mismo.

Por otro lado, el sitio de unión de *ORE1* en *proAtCV* también fue caracterizado y para este factor existe un mayor consenso en la secuencia de unión al DNA. En Inseop et al. (2023) el sitio de unión caracterizado para este '*maestro regulador de la senescencia*' es una secuencia de 7 pb, TTNCGTGA.

Aislamiento de factores NAC

En su secuencia genómica, tanto *GmRD26* como *GmORE1* presentan 2 intrones. En ambos casos, la secuencia del dominio NAC de la proteína es interrumpida por el primer intrón. Esto concuerda con lo reportado por Melo et al. (2018) donde se indica que el dominio NAC está codificado en una secuencia que da lugar a 150-200 aminoácidos conservados, y que a nivel genómico se encuentra interrumpido por un intrón.

La amplificación de *GmRD26* no supuso un problema para la realización de este trabajo. Posiblemente, esto fue debido a un correcto manejo experimental así como la presencia de una buena cantidad de transcrito en la muestra de partida para la amplificación (que además es respaldado por los datos de transcriptómica presentados en la Figura 4). Además, los primers empleados para la PCR si bien presentaban extremos con sitios de restricción no complementarios a la secuencia adyacente, su tamaño era de 9 y 10 pb (sentido y antisentido respectivamente) y existía una complementariedad parcial entre algunas bases del extremo agregado y la secuencia adyacente en la hebra hibridada. En el caso del primer sentido, la

cantidad de mismatches generadas por el agregado de bases es de 5 de 9 mientras que para el antisentido es de 4 de 10, en ambos casos con mismatch en las 2 bases más próximas a 3'. En principio, el agregado de una secuencia corta y parcialmente complementaria (correspondiente al agregado del sitio de restricción) parecería no haber tenido un gran impacto en la capacidad de hibridación de los cebadores; la hibridación absoluta era de 44% para la hebra sentido y de 60% para la antisentido.

La amplificación de *GmORE1*, en cambio, requirió poner a punto el protocolo de una forma más ardua. Si bien los primers empleados en esta amplificación son de largo similar a los empleados para amplificar *GmRD26*, la cantidad de bases no complementarias es superior. En el caso del cebador de la hebra sentido, 4 de 9 pb no son complementarios mientras que en la antisentido 7 de 12. De la misma forma que en el caso anterior, hay un mismatch en las 2 bases más próximas a 3' y en forma absoluta la hibridación era de 55% para la hebra sentido y de 42% para la antisentido. Es posible que la eficiencia de los primers haya tenido un impacto negativo en la amplificación del transcrito. A su vez, los ensayos de transcriptómica indican que el *fold change* en la expresión de *GmORE1* no es tan agudo como en el caso de *GmRD26* (1,3 versus 6,3 veces), indicando que quizás el molde de partida para la amplificación fue escaso. En la Figura 6C, se constata que efectivamente hubo amplificación con el par de cebadores empleados, pero no podemos asegurar que se trata de un único producto de amplificación. A juzgar por los resultados obtenidos posteriormente, posiblemente la extracción de RNA total de las muestras de soja quedó contaminada con DNA genómico, suficiente para ser posteriormente amplificado por PCR. En conexión con esto, el tratamiento con DNAsa luego de la extracción fue realizado de acuerdo a lo establecido, y el protocolo de extracción de RNAs totales y síntesis de cDNA se realizó 2 veces.

Generación de vectores de expresión transitoria

El sistema de clonado Gateway, permitió generar 2 construcciones que de ser correctamente transformadas, tienen potencialidad de funcionar como un *switch* donde la transcripción del gen NAC, es inducible por el agregado de β -estradiol. En este sentido, hemos generado dos sistemas de expresión transitoria que permitirán el estudio de la acción de las proteínas *GmORE1* y *GmRD26* en la modulación del promotor de *GmCV1* en plantas de *Arabidopsis*. Esto representa una gran ventaja, en contraposición a la generación de transgénicos que presentan expresión constitutiva (o no transitoria) de genes como los que son objeto de estudio en este trabajo (involucrados en respuestas fisiológicas como senescencia), cuya sobreexpresión es potencialmente letal. La expresión de factores de transcripción implicados en respuestas. En este tipo de casos, la capacidad de controlar la expresión génica de forma dependiente de dosis (de acuerdo al agregado de β -estradiol) y temporal permite realizar un seguimiento mayor, del efecto de las proteínas para las que codifican dichos genes. Además otra de las ventajas de este sistema

es que la misma planta donde evaluamos la expresión del factor de transcripción, en estado de no-inducción (sin agregado de β -estradiol) actúa como control negativo.

Ventajas y desventajas de la estrategia

Una estrategia de trabajo válida podría haber sido transformar en *Arabidopsis* con proCV1:GUS y el sistema inducible en un mismo evento de transformación. La ventaja de la estrategia empleada está en que, al sobretransformar la línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que ya fue transformada con proCV1:GUS, partimos de un sistema donde el efecto de posición de la inserción de proCV1:GUS es el mismo para todas las plantas transformadas en este trabajo. Es decir, el efecto posicional producto de la integración de proCV1:GUS en una región del genoma es el mismo para todas las plantas que fueron sobretransformadas. Esto representa una ventaja porque permite reducir la cantidad de variables que participan en la regulación de la actividad del gen reportero.

Una de las principales desventajas de este sistema en el trabajo en plantas de soja es que la actividad del mismo parecería ser desregulada por la presencia endógena de fitoestrógenos (Zuo & Chua, 2000).

Clonado de la secuencia de GmORE1

Debido a la dificultad presentada en la amplificación de la secuencia codificante de *GmORE1*, el paso de generación del vector de entrada resultó dificultoso. La verificación de la incorporación del inserto de tamaño esperado se vió afectada debido al ensayo de restricción empleado. La enzima de restricción *NcoI* presenta un sitio de corte CCATGG, el cual se genera en la secuencia codificante de *GmORE1* por remoción del primer intrón. A priori, como el vector no presenta un sitio de corte, se esperaba que en caso de haber clonado la secuencia genómica no hubiese corte por la enzima. Resultó que el primer empleado para amplificar la hebra sentido del gen presenta en las bases agregadas para generar el sitio de restricción de *KpnI*, una parte del sitio de reconocimiento y corte de *NcoI* (concretamente CC), que se termina de completar con las bases del primer que hibridan la secuencia (ATGG). De esta forma, se generó un sitio no previsto de corte para la enzima. Por otro lado, se observa en la Figura 10C que el patrón de restricción del clon 2 presenta una banda de 800 pb y otra de 200 pb (que en los otros clones sólo aparece una de ~1000 pb). Este patrón de corte se corresponde con el clonado de la secuencia codificante de *GmORE1*. Lo extraño es que el resultado de secuenciación de este plásmido, devolvió la secuencia genómica (con intrones) del gen, lo cuál a priori no se corresponde con el resultado observado en el ensayo de digestión. Atribuimos esta discrepancia de resultados a un error en el etiquetado de las muestras de plásmido extraídas de los clones analizados. Debido a esto, también se realizó la recombinación LR con este clon, lo que resultó en un vector de expresión

para la secuencia codificante de *GmORE1* con intrones. Esto no necesariamente representa un problema; se buscó transformar la región codificante de la proteína porque como la expresión ocurre en un sistema heterólogo, queríamos asegurar que se exprese la proteína producto de la secuencia codificante específica. Esta técnica permite descartar la posibilidad de que se promueva el procesamiento del mRNA en una variante de *splicing* no deseada (ambos genes presentan 2 intrones y 3 exones). Para verificar si efectivamente ocurre el procesamiento óptimo de este mensajero, se podría realizar extracción de RNA a partir de muestras de la planta bajo inducción de la transcripción del factor, sintetizar cDNA y enviar a secuenciar. Esto permitiría verificar el procesamiento del transcrito y constatar si ocurre *splicing* alternativo al esperado (aunque a la fecha, no hayan variantes reportadas de *splicing* para ninguno de los 2 genes). De todas formas, evidencia publicada hace varios años, que en el último tiempo ha adquirido mayor relevancia, indica que los intrones parecerían actuar como una fuerza primaria en la expresión de determinados genes, algo que parecería contradecir el paradigma establecido en este campo (Rose, 2019). Trabajos publicados hace más de 20 años, ya concluían que la ausencia de uno o más intrones en el gen de la enzima Alcohol deshidrogenasa 1 (*Adh1*) de *Zea mays L.* (maíz) modulaba negativamente la expresión del mismo hasta 100 veces (Callis et al., 1987).

Transformación de *Arabidopsis thaliana*

La transformación del vector de expresión se realizó sobre plantas de *A. thaliana* que presentaban en su genoma la construcción proCV1:GUS. La principal ventaja de trabajar sobre este sistema heterólogo está en que la actividad medida de GUS debería depender en buena medida de la modulación por el factor de transcripción. Si bien ambos sistemas están evolutivamente relacionados, a priori, podríamos suponer que el efecto de los moduladores de la transcripción de *Arabidopsis* no deberían tener un efecto significativo en la modulación de *proCV1* de soja bajo la condición de inducción de expresión. De todas formas, en caso de que esto ocurra, sería evidenciable en las plantas transformadas con el vector vacío. En ese caso, este control nos permitiría detectar si hay alguna proteína de *Arabidopsis*, capaz de modular la expresión de GUS a nivel de proCV1 o si el sistema presenta fugas (*leaks* o eventos de transcripción que no resultan de una inducción voluntaria).

La transformación de plantas se realizó con un método similar al de Clough & Bent (1998) sólo que se optó por depositar una gota de la solución de infiltración en cada flor, en lugar de hacer un dip floral. En base a la experiencia en trabajos similares en el laboratorio, hemos determinado que este método incrementa la eficiencia de transformación, así como disminuye la posibilidad de proliferación de hongos (que perjudican el avance del ensayo).

Conclusiones y perspectivas

Se logró generar los vectores de expresión inducible para ambos factores de transcripción de la familia NAC: *GmRD26* y *GmORE1*, empleando el sistema de clonado Gateway LR. Los mismos fueron satisfactoriamente transformados en *Arabidopsis thaliana* transgénicas con proCV1:GUS y se cosecharon las vainas producidas por las mismas. Una alícuota de las semillas de las plantas transformadas con el vector de expresión de *GmRD26* fue sembrada en medio con selección y se seleccionó aquellas que presentaron crecimiento destacado se trasplantaron a tierra. Posteriormente, se logró realizar la caracterización molecular de la presencia o ausencia de *GmRD26* en el genoma de la planta por amplificación del gen a partir de una extracción de DNA genómico. Finalmente, se obtuvieron 9 líneas que resultaron positivas y que aparentemente incorporaron el gen.

Como perspectiva a futuro, se cosecharon las semillas de las plantas transformadas con *GmORE1* y están almacenadas para su posterior germinación, selección y caracterización molecular. A partir de estas, se deberían poder obtener líneas que hayan incorporado el transgén.

Ambos sistemas serán de utilidad para continuar dilucidando los mecanismos a través de los cuales se regula la actividad del promotor de *GmCV1*. Estos ensayos permitirán aceptar o negar la hipótesis de que estos 2 factores de transcripción de la familia NAC, *GmORE1* y *GmRD26*, promueven la transcripción de *CV1* y por lo tanto participan en la inducción de la senescencia cloroplástica por esta vía independiente de autofagia. A futuro se podrían desarrollar ensayos de inducción con β -estradiol sobre estas líneas transgénicas y medir la actividad de GUS. Incluso, una de las ventajas del sistema Gateway es que una vez se tiene el gen clonado en un vector de entrada, podemos subclonarlo en otro vector de destino optimizado para otro tipo de ensayos que permitan por ejemplo, determinar si el factor de transcripción interactúa con otra proteína a nivel del núcleo (por ej. mediante un ensayo de inmunoprecipitación). Quizás sería interesante analizar qué ocurre cuando se induce la expresión de estos factores transcripción en soja con un fenotipo de tolerancia a estrés hídrico, ¿qué genes se verían diferencialmente regulados? ¿Se mantiene el fenotipo de tolerancia? etc.

Por otro lado, estos vectores de expresión podrían ser empleados en otros trabajos. Actualmente, otra línea de este proyecto está trabajando con la generación de mutaciones puntuales en el promotor de *CV1*, cuyo efecto en los niveles de transcripción del gen se podrían medir por co-transformación del vector de expresión generado en este trabajo. Es decir, si estos factores de la familia NAC inducen transcripción de *CV1*, entonces se podría analizar qué regiones del promotor efectivamente participan en la regulación de la transcripción mediada por alguno de estos 2 factores NAC (o ambos).

Anexo

Abreviaciones

DNA - deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico).
 RNA - ribonucleic acid (ácido ribonucleico).
 cDNA - copy Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico copia).
 CVV - chloroplast vesiculation vesicles (vesículas de vesiculación cloroplástica).
At - *Arabidopsis thaliana*.
Gm - *Glycine max*.
 proCV1 - promotor de CV1.
 ON - overnight (toda la noche).
 NTES - NaCl, Tris-HCl, EDTA, SDS.
 EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético).
 rpm - revolutions per minute (revoluciones por minuto).
 DEPC - diethylpyrocarbonate (dietilpirocarbonato).
 LB - lysogeny broth.
 YEP - yeast extract peptone.
 DO - difracción óptica.
 MS - Murashige y Skoog.
 TAE - tris, acetate & EDTA (tris, acetato y EDTA).
 TE - tris EDTA.
 CTAB - cetyltrimethylammonium bromide (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).
 gDNA - genomic deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico genómico).
 NAC - NAM (no apical meristem), ATAF1/2 y CUC2 (cup-shaped cotyledon).
 PCR - polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).
 CDS - coding sequence (secuencia codificante).
 UTR - untranslated region (región no traducida).
 ATG - autophagy (autofagia).
 iRNA - interference ribonucleic acid (ácido ribonucleico de interferencia).
 SDS - sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico).
 EtOH - ethanol (etanol).

Figuras anexas

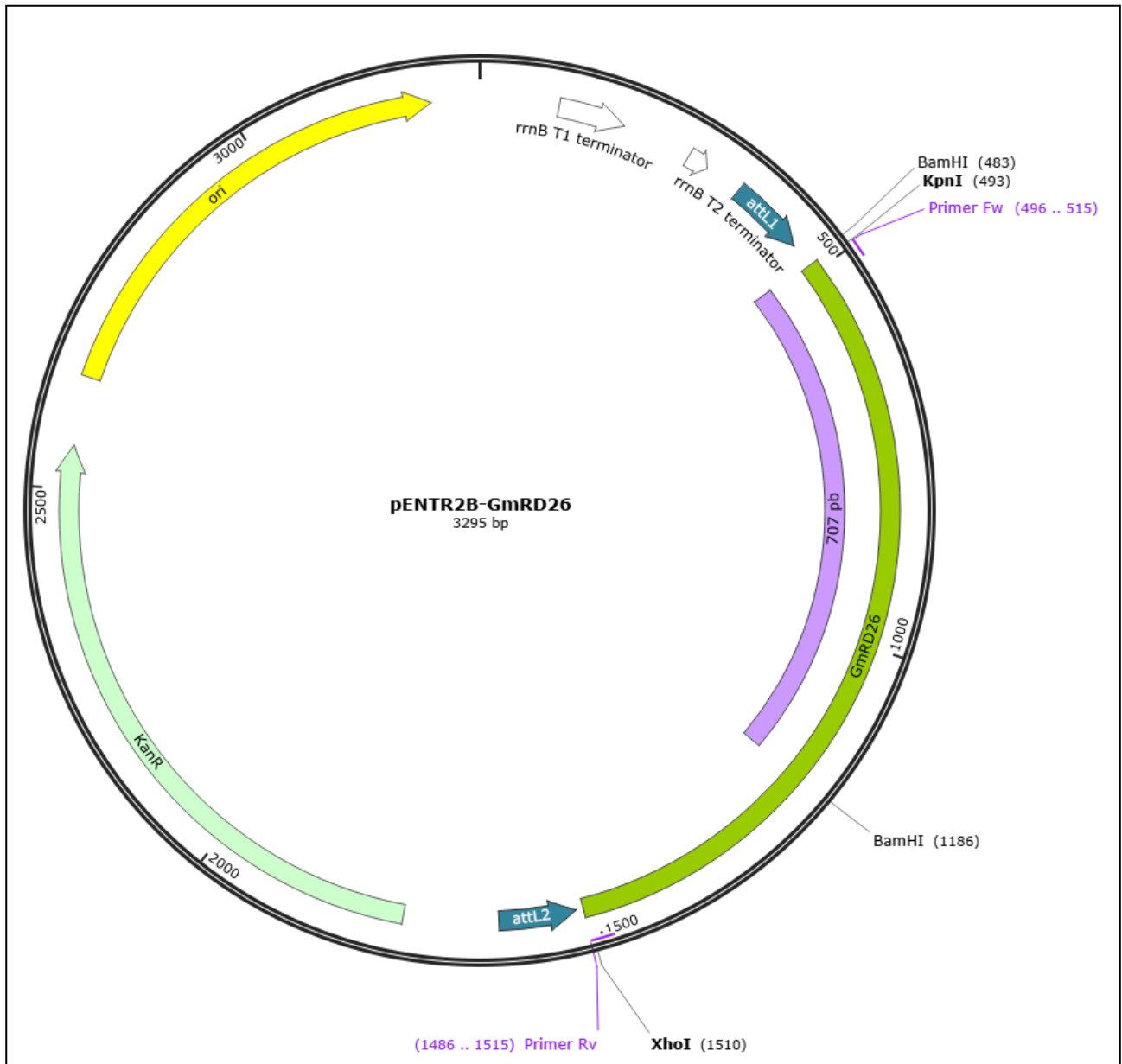


Figura A1. Mapa del vector de entrada pENTR2B clonado con la secuencia codificante de *GmRD26*. Se señalan los sitios de restricción de las enzimas empleadas en la verificación por ensayos de restricción, así como el tamaño teórico de los fragmentos que se liberarían, el inserto y la posición donde los primers empleados para amplificar el mismo hibridan.

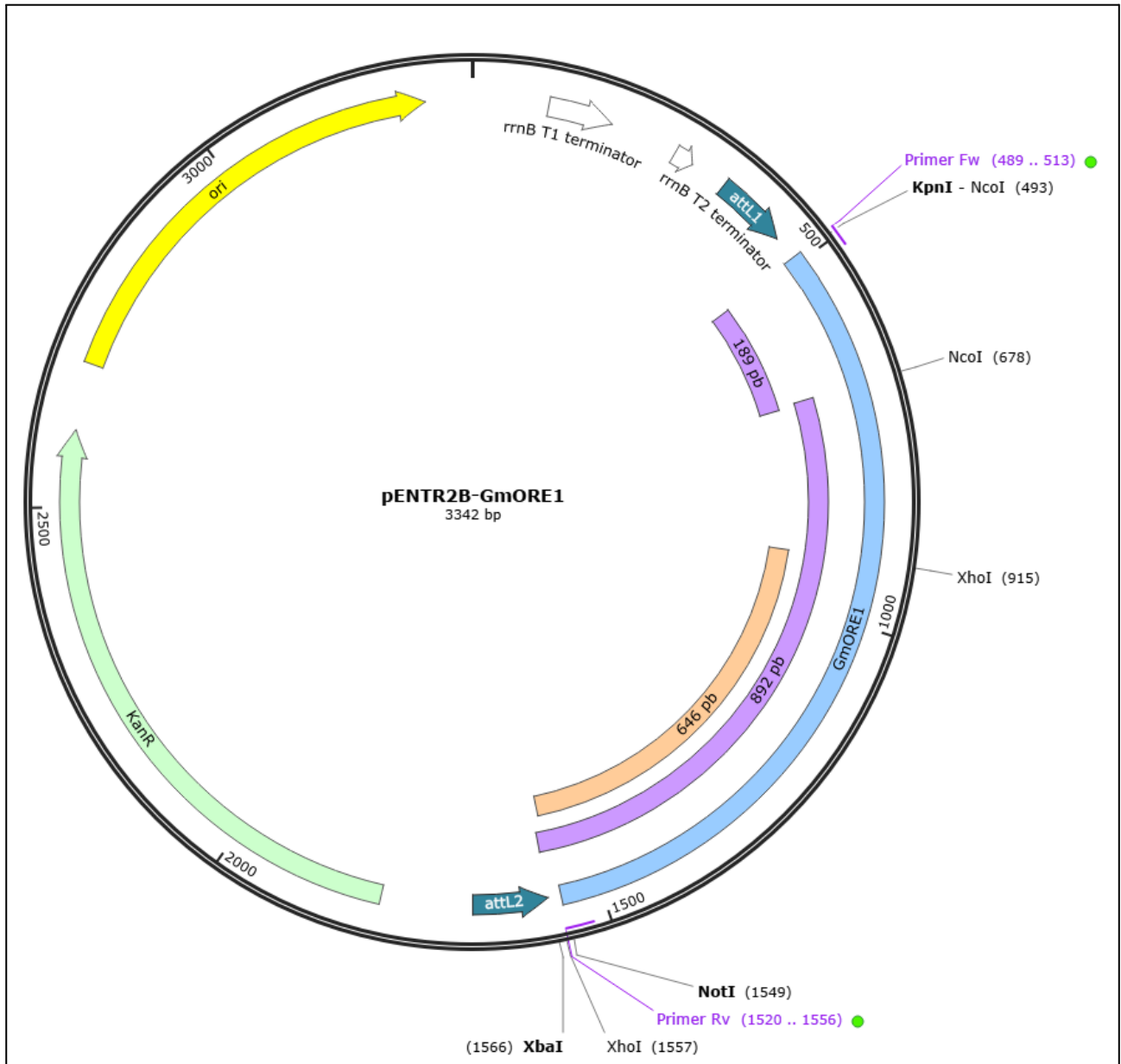


Figura A2. Mapa del vector de entrada pENTR2B clonado con la secuencia codificante de *GmORE1*. Se señalan los sitios de restricción de las enzimas empleadas en la verificación por ensayos de restricción, así como el tamaño teórico de los fragmentos que se liberarían, el inserto y la posición donde los primers empleados para amplificar el mismo hibridan.

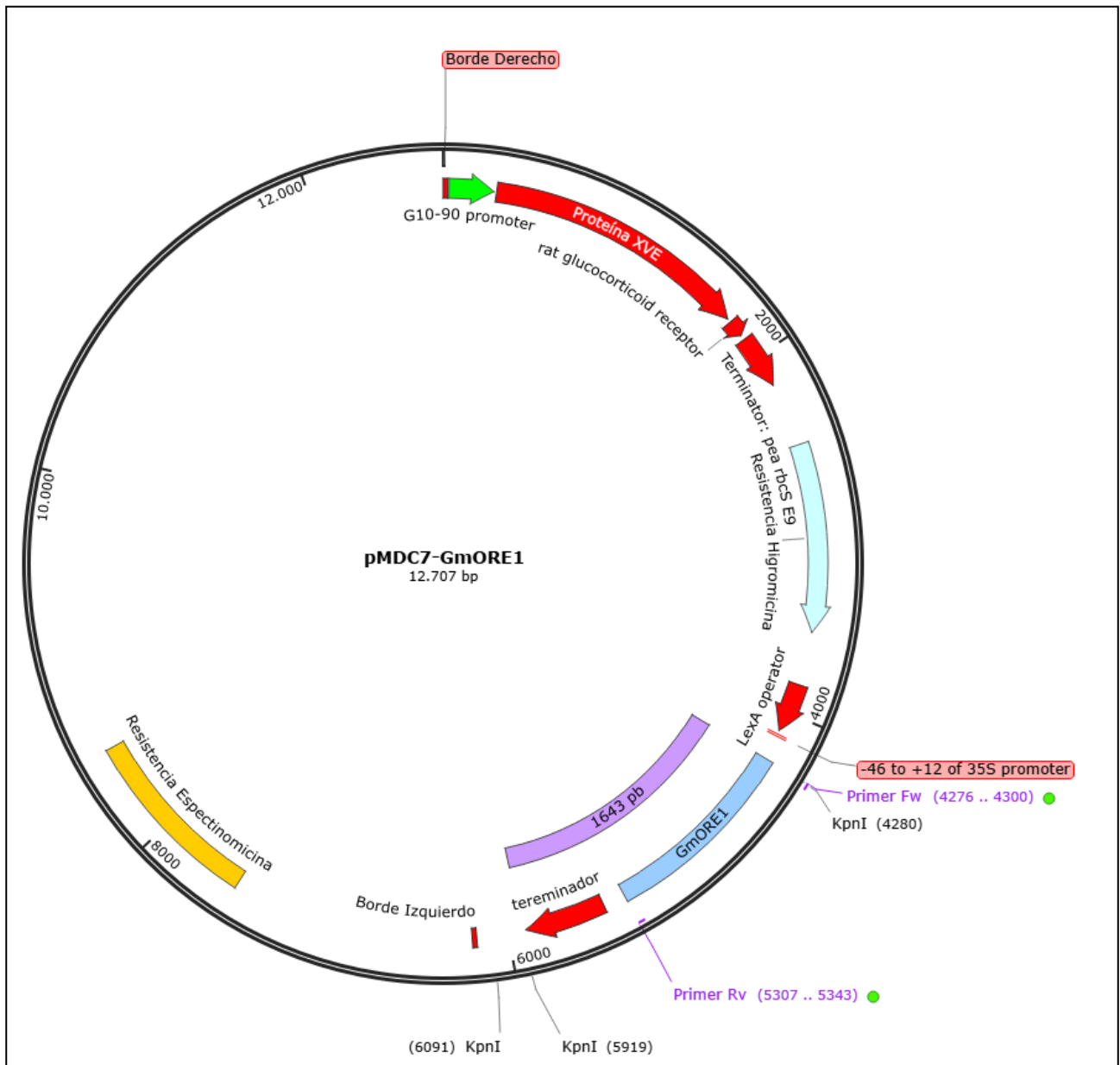


Figura A3. Mapa del vector de entrada pMDC7 clonado con la secuencia codificante de *GmORE1*. Se señalan los sitios de restricción de las enzimas empleadas en la verificación por ensayos de restricción, así como el tamaño teórico de los fragmentos que se liberarían, el inserto y la posición donde los primers empleados para amplificar el mismo hibridan.

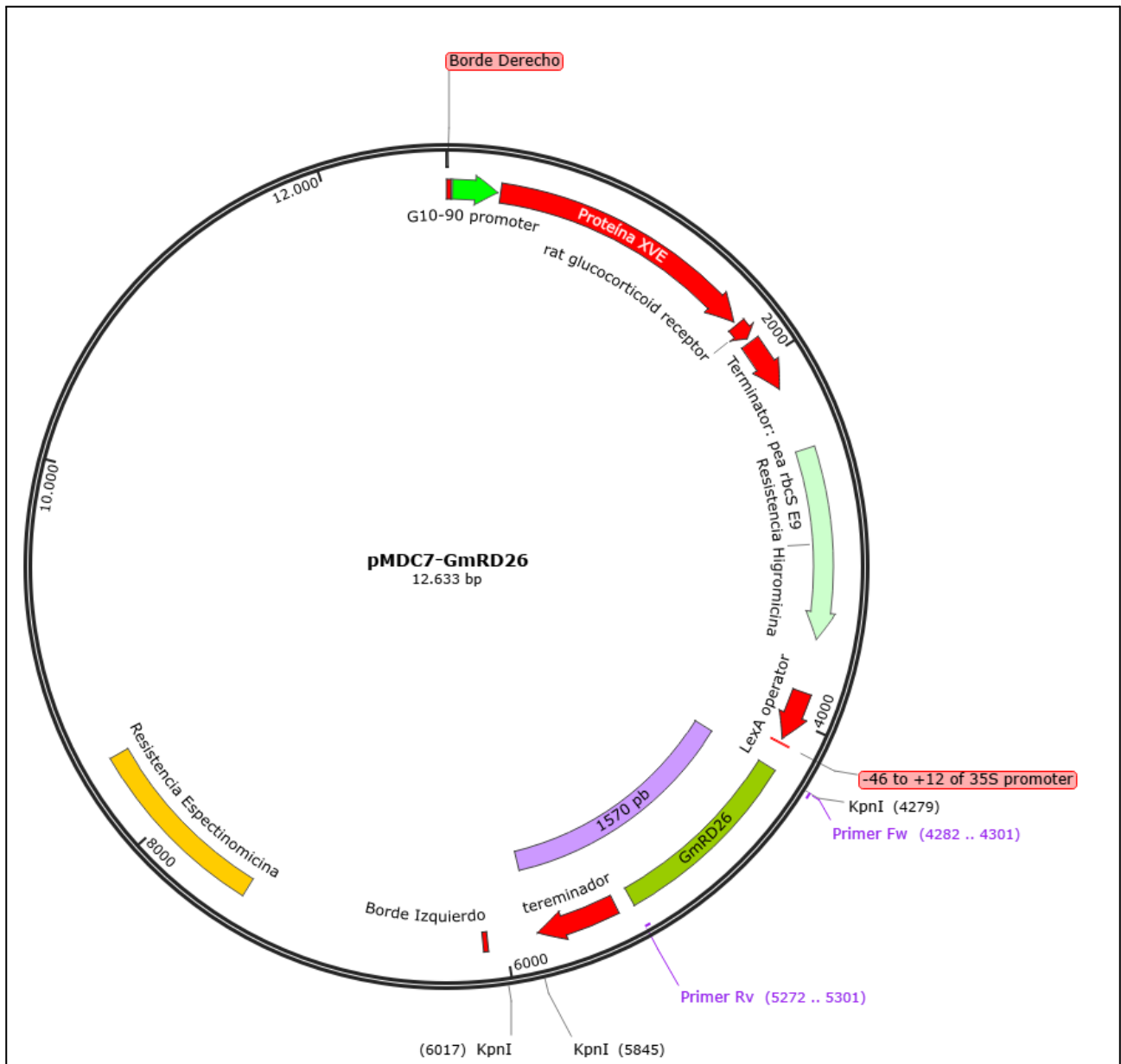


Figura A4. Mapa del vector de entrada pMDC7 clonado con la secuencia codificante de *GmRD26*. Se señalan los sitios de restricción de las enzimas empleadas en la verificación por ensayos de restricción, así como el tamaño teórico de los fragmentos que se liberarían, el inserto y la posición donde los primers empleados para amplificar el mismo hibridan.

Primeros pasos de clonado de GmORE1 en pENTR2B

Para la generación del vector de entrada pENTR2B-GmORE1, en primera instancia se optó por seguir un protocolo similar al de la generación de pENTR2B-GmRD26. Una vez se amplificó la secuencia a partir de cDNA, se digirió tanto el vector como el inserto con *KpnI* y *NotI*. Además, el vector fue desfosforilado para prevenir autoligación (aún habiendo generado extremos no re-ligables). Se llevó a cabo la reacción de ligación ON con proporciones vector e inserto 1:3. Esta mezcla se transformó en células *E. coli* TOP10 electrocompetentes y se plaquearon en medio con selección. De las colonias obtenidas, 8 fueron chequeadas mediante PCR de colonia amplificando

la secuencia de *GmORE1*. En la figura A5 se muestra el resultado de dicho ensayo, dónde se esperaba obtener un fragmento de 1315 pb.

Se realizó minipreparación para 6 de los 8 clones (positivos en el ensayo descrito anteriormente) y se verificó la presencia del inserto mediante un ensayo de digestión con la enzima *XhoI*. Esta enzima presenta un sitio de corte en el vector y en la secuencia codificante del gen. En la figura A5B se presentan los resultados del mismo, esperábamos ver un fragmento de 632 pb y otro de 2677 pb. Debido a que las bandas observadas en el gel no permitieron concluir acerca de la identidad del fragmento clonado, se optó por realizar otro ensayo de digestión. Para este, se emplearon las enzimas *NcoI*, que presenta un sitio de corte en el gen (que se forma por procesamiento del 1er intrón en dirección 5' a 3'), y *XbaI* que presenta un sitio de corte en el vector. En la figura A5C se presentan los resultados del ensayo de digestión, para el cual se esperaban un fragmento de 886 pb y otro de 2453 pb. Si bien se observa un fragmento de ~2400 pb, se obtuvo una banda cerca de 1159 pb del marcador de peso molecular. Debido a que este resultado no concordó con lo esperado, se optó por amplificar el gen a partir de estos plásmidos y correr un gel de agarosa 1%, de largo suficiente como para aumentar la resolución de bandas. En la figura A5D se observan los resultados de la amplificación, donde se observa un fragmento de tamaño superior al esperado de 1074 pb. A raíz de este resultado, se optó por comenzar de nuevo volviendo a amplificar el gen a partir de una muestra de cDNA.

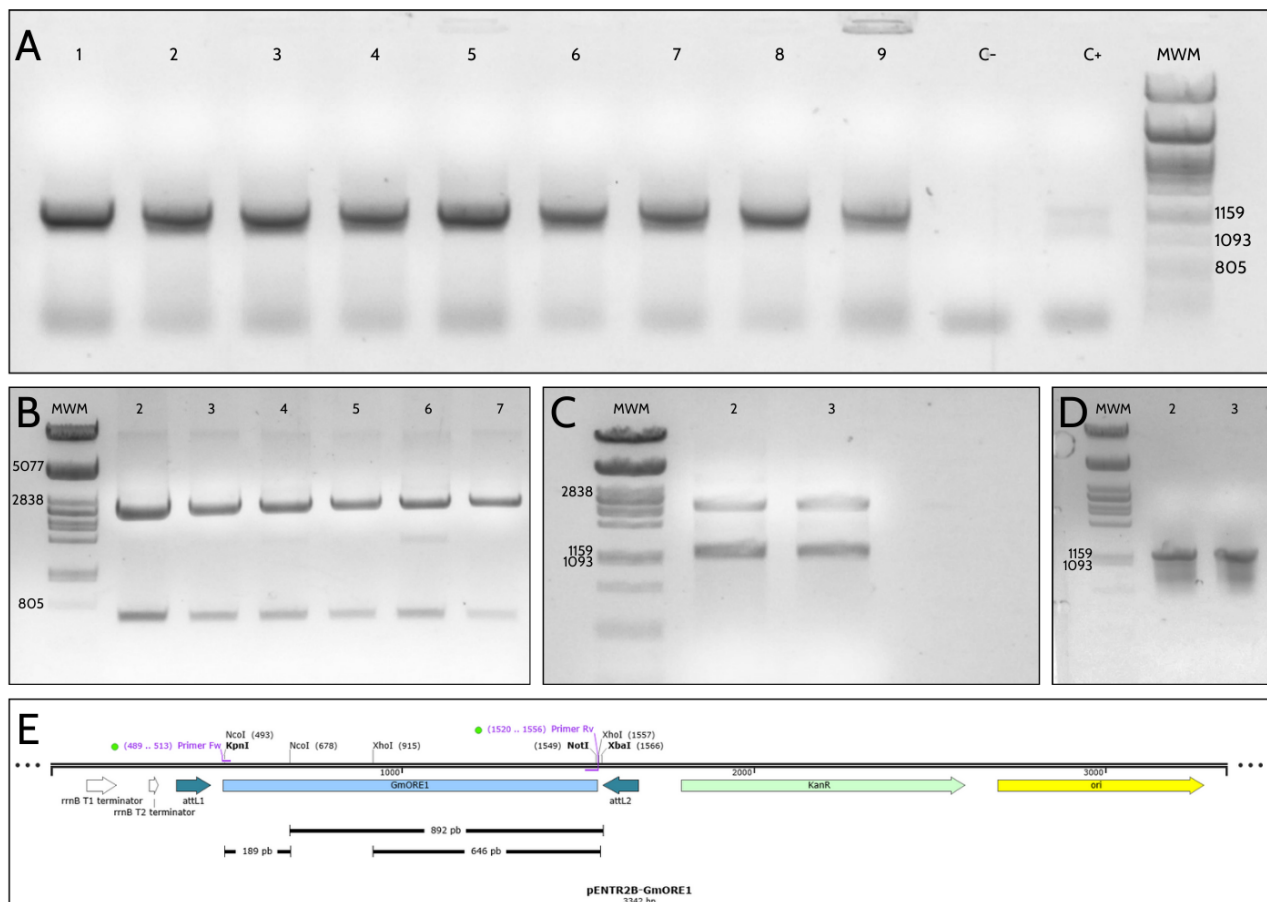


Figura A5. (A) Amplificación por PCR a tiempo final de *GmORE1* a partir de 9 clones seleccionados de la placa de transformación de *E. coli* con la mezcla de ligación de pENTR2B y *GmORE1*. Se observa que en todos los clones, así como el control positivo, se observa amplificación de una banda de ~1200 pb. (B) Ensayo de digestión con *XhoI* del plásmido extraído de los clones 2, 3, 4, 5, 6 y 7. Se observa la liberación de un fragmento de ~600 pb y otro de ~2500 pb. (C) Ensayo de digestión con *XbaI* y *NcoI* de plásmidos extraídos de los clones 2 y 3. Para ambas digestiones se observa una banda de ~2400 pb y otra de ~1200 pb. (D) Amplificación por PCR a tiempo final de *GmORE1* usando como molde los plásmidos extraídos de los clones 2 y 3. (E) Diagrama lineal del vector pENTR2B clonado con la secuencia codificante de *GmORE1*. En el mismo se muestran señalados los sitios de restricción para las enzimas empleadas en los ensayos de restricción, así como los fragmentos que se liberarían de la digestión con las mismas.

Bibliografía

- Abdullah, M., Cao, Y., Cheng, X., Shakoar, A., Su, X., Gao, J., & Cai, Y. (2018). Genome-Wide Analysis Characterization and Evolution of SBP Genes in *Fragaria vesca*, *Pyrus bretschneideri*, *Prunus persica* and *Prunus mume*. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00064>
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscissic Acid Signaling. *The Plant Cell*, 15(1), 63–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.006130>
- Agricultural Development Economics Division, FAO. (2009). *Global agriculture towards 2050*. https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf
- Ahouvi, Y., Haber, Z., Zach, Y. Y., Rosental, L., Toubiana, D., Sharma, D., Alseekh, S., Tajima, H., Fernie, A. R., Brotman, Y., Blumwald, E., & Sade, N. (2022). The Alteration of Tomato Chloroplast Vesiculation Positively Affects Whole-Plant Source–Sink Relations and Fruit Metabolism under Stress Conditions. *Plant and Cell Physiology*, 63(12), 2008–2026. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac133>
- Aksoy, E., Yavuz, C., Yagiz, A. K., Unel, N. M., & Baloğlu, M. C. (2024). Genome-wide characterization and expression analysis of GATA transcription factors under combination of light wavelengths and drought stress in potato. *Plant Direct*, 8(4). <https://doi.org/10.1002/pld3.569>
- Albrecht, S. L., Bennett, J. M., & Boote, K. J. (1984). Relationship of nitrogenase activity to plant water stress in field-grown soybeans. *Field Crops Research*, 8, 61–71. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(84\)90052-2](https://doi.org/10.1016/0378-4290(84)90052-2)
- Amine-Khodja, I. R., Boscari, A., Riah, N., Kechid, M., Maougal, R. T., Belbekri, N., & Djekoun, A. (2022). Impact of Two Strains of *Rhizobium leguminosarum* on the Adaptation to Terminal Water Deficit of Two Cultivars *Vicia faba*. *Plants*, 11(4), 515. <https://doi.org/10.3390/plants11040515>
- Balazadeh, S., Riaño-Pachón, D. M., & Mueller-Roeber, B. (2008). Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 10(10), 63–75. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00088.x>
- Balazadeh, S., Siddiqui, H., Allu, A. D., Matallana-Ramirez, L. P., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanol, M.-I., Köhler, B., & Mueller-Roeber, B. (2010). A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *The Plant Journal*, 62(2), 250–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2010.04151.x>

- Bernard, P., & Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology*, 226(3), 735–745. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90629-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90629-x)
- Bevan, M. W., Flavell, R. B., & Chilton, M.-D. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304(5922), 184–187. <https://doi.org/10.1038/304184a0>
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Bresson, J., Bieker, S., Riester, L., Doll, J., & Zentgraf, U. (2017). A guideline for leaf senescence analyses: from quantification to physiological and molecular investigations. *Journal of Experimental Botany*, 69(4), 769–786. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx246>
- Brookes, G. (2022). Farm income and production impacts from the use of genetically modified (GM) crop technology 1996-2020. *GM Crops & Food*, 13(1), 171–195. National Library of Medicine. <https://doi.org/10.1080/21645698.2022.2105626>
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J., Wu, S.-H., Swidzinski, J. A., Ishizaki, K., & Leaver, C. J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Journal*, 42(4), 567–585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2005.02399.x>
- Callis, J., Fromm, M., & Walbot, V. (1987). Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes & Development*, 1(10), 1183–1200. <https://doi.org/10.1101/gad.1.10.1183>
- Cao, J., Liu, H., Tan, S., & Li, Z. (2023). Transcription Factors-Regulated Leaf Senescence: Current Knowledge, Challenges and Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9245–9245. <https://doi.org/10.3390/ijms24119245>
- Cardoso, L. L., Freire, F. B. S., & Daloso, D. M. (2022). Plant Metabolic Networks Under Stress: a Multi-species/Stress Condition Meta-analysis. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-01032-2>
- Cerezini, P., Harumi Kuwano, B., Grunvald, A. K., Hungria, M., & Nogueira, M. A. (2020). Soybean tolerance to drought depends on the associated Bradyrhizobium strain. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 1977–1986. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00375-1>
- Chen, Z., Wu, Z., Dong, W., Liu, S., Tian, L., Li, J., & Du, H. (2022). MYB Transcription Factors Becoming Mainstream in Plant Roots. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9262. <https://doi.org/10.3390/ijms23169262>
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N. K., Makino, A., & Mae, T. (2003). Exclusion of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/oxygenase from Chloroplasts by Specific Bodies in Naturally Senescing Leaves of Wheat. *Plant Cell Physiology*, 44(9), 914–921.

- 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>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S. L., & Tonelli, C. (2005). A Guard-Cell-Specific MYB Transcription Factor Regulates Stomatal Movements and Plant Drought Tolerance. *Current Biology*, 15(13), 1196–1200. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.048>
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species*. Alma Classics. (Original work published 1859)
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418(6898), 700–707. <https://doi.org/10.1038/nature01019>
- Díaz-Mendoza, M., Velasco-Arroyo, B., Santamaría, M. E., González-Melendi, P., Martínez, M., & Díaz, I. (2016). Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 329–338. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0015>
- DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de Uruguay). (2023). *ANUARIO ESTADÍSTICO AGROPECUARIO 2023* (pp. 108–120). <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-agropecuario-2023> (Original work published 2023)
- Doebley, J. F., Gaut, B. S., & Smith, B. D. (2006). The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, 127(7), 1309–1321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.006>
- Domínguez, F., & Cejudo, F. J. (2021). Chloroplast dismantling in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 72(16), 5905–5918. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab200>
- Ellis, R. John. (1979). The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*, 4(11), 241–244. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(79\)90212-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(79)90212-3)
- FAOSTAT. (2022). *Crops and livestock products*. Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Licence: CC-BY-4.0.
- Farooq, M., Gogoi, N., Barthakur, S., Baroowa, B., Bharadwaj, N., Alghamdi, S. S., & Siddique, K. H. M. (2016). Drought Stress in Grain Legumes during Reproduction and Grain Filling. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(2), 81–102. <https://doi.org/10.1111/jac.12169>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1184020>

- Food And Agriculture Organization Of The United Nations. (2017). *The future of food and agriculture : trends and challenges*. Food And Agriculture Organization Of The United Nations. <https://www.fao.org/3/i6583e/i6583e.pdf>
- Foreign Agricultural Service U.S. Department of Agriculture. (2024, July). *Soybean Explorer*. Soybean Explorer. https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=2222000&sel_year=2023&rankby=Imports
- Foyer, C. H., Lam, H.-M., Nguyen, H. T., Siddique, K. H. M., Varshney, R. K., Colmer, T. D., Cowling, W., Bramley, H., Mori, T. A., Hodgson, J. M., Cooper, J. W., Miller, A. J., Kunert, K., Vorster, J., Cullis, C., Ozga, J. A., Wahlqvist, M. L., Liang, Y., Shou, H., & Shi, K. (2016). Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants*, 2(8). <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.112>
- Foyer, C., & Noctor, G. (2005). Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell*, 17, 1866–1875.
- Freitas, E. O., Melo, B. P., Lourenço-Tessutti, I. T., Arraes, F. B. M., Amorim, R. M., Lisei-de-Sá, M. E., Costa, J. A., Leite, A. G. B., Faheem, M., Ferreira, M. A., Morgante, C. V., Fontes, E. P. B., & Grossi-de-Sa, M. F. (2019). Identification and characterization of the GmRD26 soybean promoter in response to abiotic stresses: potential tool for biotechnological application. *BMC Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0561-3>
- Gallino, J. P., Ruibal, C., Casaretto, E., Fleitas, A. L., Bonnacarrère, V., Borsani, O., & Vidal, S. (2018). A Dehydration-Induced Eukaryotic Translation Initiation Factor iso4G Identified in a Slow Wilting Soybean Cultivar Enhances Abiotic Stress Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00262>
- Gao, J., Liu, N., Wang, X., Niu, Z., Liao, Q., Ding, R., Du, T., Kang, S., & Tong, L. (2024). Maintaining grain number by reducing grain abortion is the key to improve water use efficiency of maize under deficit irrigation and salt stress. *Agricultural Water Management*, 294, 108727–108727. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2024.108727>
- Gounaris, K., & Barber, J. (1983). Monogalactosyldiacylglycerol: The most abundant polar lipid in nature. *Trends in Biochemical Sciences*, 8(10), 378–381. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90366-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90366-3)
- Guo, J., Bai, X., Dai, K., Yuan, X., Guo, P., Zhou, M., Shi, W., & Hao, C. (2021). Identification of GATA Transcription Factors in *Brachypodium distachyon* and Functional Characterization of BdGATA13 in Drought Tolerance and Response to Gibberellins. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.763665>
- Guo, Y., & Gan, S. (2005). Leaf Senescence: Signals, Execution, and Regulation. *Current Topics in Developmental Biology*, 71, 83–112. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(05\)71003-6](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(05)71003-6)

- Guo, Y., Ren, G., Zhang, K., Li, Z., Miao, Y., & Guo, H. (2021). Leaf senescence: progression, regulation, and application. *Molecular Horticulture*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/s43897-021-00006-9>
- Hajibarat, Z., & Saidi, A. (2022). Senescence-associated proteins and nitrogen remobilization in grain filling under drought stress condition. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00378-5>
- Heytler, P. G., & Hardy, R. (1984). Calorimetry of Nitrogenase-Mediated Reductions in Detached Soybean Nodules. *Plant Physiology*, 75(2), 304–310. <https://doi.org/10.1104/pp.75.2.304>
- Honig, A., Avin-Wittenberg, T., Ufaz, S., & Galili, G. (2012). A New Type of Compartment, Defined by Plant-Specific Atg8-Interacting Proteins, Is Induced upon Exposure of Arabidopsis Plants to Carbon Starvation. *The Plant Cell*, 24(1), 288–303. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093112>
- Inseop, C., Hyo Jung, K., Sunghyun, H., Yeon-Gil, K., & Min-Sung, K. (2023). Structural basis of DNA binding by the NAC transcription factor ORE1, a master regulator of plant senescence. *Plant Communications*, 4(3), 100510–100510. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100510>
- Invitrogen. (2008). *User Manual Gateway® pENTR™ Dual Selection Vectors* (p. 8). https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pentrdualselectionvectors_man.pdf
- James, M., Masclaux-Daubresse, C., Marmagne, A., Azzopardi, M., Laîné, P., Goux, D., Etienne, P., & Trouverie, J. (2019). A New Role for SAG12 Cysteine Protease in Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01998>
- Jenks, M. A., & Hasegawa, P. M. (2008). *Plant Abiotic Stress* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Jiang, H., Tang, B., Xie, Z., Nolan, T. M., Ye, H., Song, G., & Walley, J. W. (2019). GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates RD26 to potentiate drought signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 100(5), 923–937. <https://doi.org/10.1111/tpj.14484>
- Josefat, G. J., Villalobos-López, M. A., Chavarría-Alvarado, K. L., Ríos-Meléndez, S., López-Meyer, M., & Arroyo-Becerra, A. (2020). Genome-wide transcriptional changes triggered by water deficit on a drought-tolerant common bean cultivar. *BMC Plant Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02664-1>
- Kamranfar, I., Xue, G.-P., Tohge, T., Sedaghatmehr, M., Fernie, A. R., Balazadeh, S., & Mueller-Roeber, B. (2018). Transcription factor RD26 is a key regulator of metabolic reprogramming during dark-induced senescence. *New Phytologist*, 218(4), 1543–1557. <https://doi.org/10.1111/nph.15127>
- Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(4), 571–589. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.4.571>

- Kelly, M. O., Davies, P. J., & Woolhouse, H. W. (1988). The control of whole plant senescence. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 7(2), 139–173. <https://doi.org/10.1080/07352688809382262>
- Keskitalo, J., Bergquist, G., Gardeström, P., & Jansson, S. (2005). A Cellular Timetable of Autumn Senescence. *Plant Physiology*, 139(4), 1635–1648. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066845>
- Kim, J. H., Woo, H. R., Kim, J., Lim, P. O., Lee, I. C., Choi, S. H., Hwang, D., & Nam, H. G. (2009). Trifurcate Feed-Forward Regulation of Age-Dependent Cell Death Involving *miR164* in *Arabidopsis*. *Science*, 323(5917), 1053–1057. <https://doi.org/10.1126/science.1166386>
- Kim, S.-H., Kwon, C., Lee, J.-H., & Chung, T. (2012). Genes for plant Autophagy: Functions and interactions. *Molecules and Cells*, 34(5), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-0098-y>
- Kirchhoff, H. (2019). Chloroplast ultrastructure in plants. *New Phytologist*, 223(2), 565–574. <https://doi.org/10.1111/nph.15730>
- Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J., & Kašparovský, T. (2019). Isoflavones. *Molecules*, 24(6), 1076. <https://doi.org/10.3390/molecules24061076>
- Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Tanaka, M., Seki, M., Ham, L. H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L.-S. P. (2012). Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissues at Late Developmental Stages under Drought Stress Revealed by Genome-Wide Transcriptome Analysis. *PLOS ONE*, 7(11), e49522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049522>
- Lee, S., Seo, P. J., Lee, H.-J., & Park, C.-M. (2012). A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 70(5), 831–844. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2012.04932.x>
- Leopold, A. C. (1961). Senescence in Plant development: The death of plants or plant parts may be of positive ecological or physiological value. *Science*, 134, 1727–1732.
- Liebers, M., Grübler, B., Chevalier, F., Lerbs-Mache, S., Merendino, L., Blanvillain, R., & Pfanschmidt, T. (2017). Regulatory Shifts in Plastid Transcription Play a Key Role in Morphological Conversions of Plastids during Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 8(23). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00023>
- Liu, Y., Xiong, Y., & Bassham, D. C. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*, 5(7), 954–963. <https://doi.org/10.4161/auto.5.7.9290>
- Ma, Z., Hu, L., & Jiang, W. (2024). Understanding AP2/ERF Transcription Factor Responses and Tolerance to Various Abiotic Stresses in Plants: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences (Online)*, 25(2), 893–893. <https://doi.org/10.3390/ijms25020893>

- Mahmood, K., El-Kereamy, A., Kim, S.-H., Nambara, E., & Rothstein, S. J. (2016). ANAC032 Positively Regulates Age-Dependent and Stress-Induced Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 57(10), 2029–2046. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw120>
- Makino, A., Sakuma, H., Sudo, E., & Mae, T. (2003). Differences between Maize and Rice in N-use Efficiency for Photosynthesis and Protein Allocation. *Plant and Cell Physiology*, 44(9), 952–956. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg113>
- Marino, D., Frendo, P., Ladrera, R., Zabalza, A., Puppo, A., Arrese-Igor, C., & González, E. M. (2007). Nitrogen Fixation Control under Drought Stress. Localized or Systemic? *Plant Physiology*, 143(4), 1968–1974. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097139>
- Martínez, D. E., Costa, M. L., Gomez, F. M., Otegui, M. S., & Guiamet, J. J. (2008). “Senescence-associated vacuoles” are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *The Plant Journal*, 56(2), 196–206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2008.03585.x>
- Matallana-Ramirez, L. P., Rauf, M., Farage-Barhom, S., Dortay, H., Xue, G.-P., Dröge-Laser, W., Lers, A., Balazadeh, S., & Mueller-Roeber, B. (2013). NAC Transcription Factor ORE1 and Senescence-Induced BIFUNCTIONAL NUCLEASE1 (BFN1) Constitute a Regulatory Cascade in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Shanghai*, 6(5), 1438–1452. <https://doi.org/10.1093/mp/sst012>
- Melo, B. P., Fraga, O. T., Silva, J. C. F., Ferreira, D. O., Brustolini, O. J. B., Carpinetti, P. A., Machado, J. P., Reis, P. A. B., & Fontes, E. P. B. (2018). Revisiting the Soybean GmNAC Superfamily. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01864>
- Metcalf, J. C., Rose, K. E., & Rees, M. (2003). Evolutionary demography of monocarpic perennials. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(9), 471–480. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(03\)00162-9](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(03)00162-9)
- Michaeli, S., Honig, A., Levanony, H., Peled-Zehavi, H., & Galili, G. (2014). *Arabidopsis* ATG8-INTERACTING PROTEIN1 Is Involved in Autophagy-Dependent Vesicular Trafficking of Plastid Proteins to the Vacuole. *The Plant Cell*, 26(10), 4084–4101. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129999>
- Miller, E. M., & Nickoloff, J. A. (1995). *Escherichia coli* Electrotransformation. In *Electroporation Protocols for Microorganisms* (pp. 105–113). Humana Press Inc.
- Miryeganeh, M. (2021). Senescence: The Compromised Time of Death That Plants May Call on Themselves. *Genes*, 12(2), 143. <https://doi.org/10.3390/genes12020143>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Nakashima, K., Tran, L.-S. P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a

- NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51(4), 617–630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03168.x>
- Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. (2014). The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. *Plant Physiology*, 164(4), 1636–1648. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233478>
- Nooden, L. D., Guiamet, J. J., & John, I. (1997). Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, 101(4), 746–753. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01059.x>
- Nooden, L. D., Rupp, D. C., & Derman, B. D. (1978). Separation of seed development from monocarpic senescence in soybeans. *Nature*, 271(5643), 354–357. <https://doi.org/10.1038/271354a0>
- Ojeda, V., Pérez-Ruiz, J. M., González, M., Nájera, V. A., Sahrawy, M., Serrato, A. J., Geigenberger, P., & Cejudo, F. J. (2017). NADPH Thioredoxin Reductase C and Thioredoxins Act Concertedly in Seedling Development. *Plant Physiology*, 174(3), 1436–1448. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00481>
- Otegui, M. S., Noh, Y.-S., Martínez, D. E., Vila Petroff, M. G., Andrew Staehelin, L., Amasino, R. M., & Guiamet, J. J. (2005). Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *The Plant Journal*, 41(6), 831–844. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2005.02346.x>
- Podzimska-Sroka, D., O'Shea, C., Gregersen, P. L., & Skriver, K. (2015). NAC Transcription Factors in Senescence: From Molecular Structure to Function in Crops. *Plants*, 4(3), 412–448. <https://doi.org/10.3390/plants4030412>
- Qi, H., Wang, Y., Bao, Y., Bassham, D. C., Chen, L., Chen, Q.-F., Hou, S., Hwang, I., Huang, L., Lai, Z., Li, F., Liu, Y., Qiu, R., Wang, H., Wang, P., Xie, Q., Zeng, Y., Zhuang, X., Gao, C., & Jiang, L. (2023). Studying plant autophagy: challenges and recommended methodologies. *Advanced Biotechnology*, 1(4). <https://doi.org/10.1007/s44307-023-00002-8>
- Quirino, B. F., Noh, Y.-S., Himelblau, E., & Amasino, R. M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science*, 5(7), 278–282. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01655-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01655-1)
- Rascio, N., & La Rocca, N. (2008). Biological Nitrogen Fixation. In *Encyclopedia of ecology*. Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080454054002731/pdf>
- Rizzo, G., & Baroni, L. (2018). Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. *Nutrients*, 10(1), 43. <https://doi.org/10.3390/nu10010043>
- Rombauts, S., Dehais, P., Van Montagu, M., & Rouze, P. (1999). PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 295–296. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.295>

- Rose, A. B. (2019). Introns as Gene Regulators: A Brick on the Accelerator. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00672>
- Rouhier, N., Koh, C. S., Gelhaye, E., Corbier, C., Favier, F., Didierjean, C., & Jacquot, J.-P. (2008). Redox based anti-oxidant systems in plants: Biochemical and structural analyses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(11), 1249–1260. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.007>
- Sade, N., Umnajkitikorn, K., Rubio Wilhelmi, M. del M., Wright, M., Wang, S., & Blumwald, E. (2017). Delaying chloroplast turnover increases water-deficit stress tolerance through the enhancement of nitrogen assimilation in rice. *Journal of Experimental Botany*, 69(4), 867–878. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx247>
- 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 translome network analysis. *BMC Plant Biology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05280-5>
- Sarwat, M., Naqvi, A. R., Ahmad, P., Ashraf, M., & Akram, N. A. (2013). Phytohormones and microRNAs as sensors and regulators of leaf senescence: Assigning macro roles to small molecules. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1153–1171. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.02.003>
- Sato, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2024). Complex plant responses to drought and heat stress under climate change. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 117. <https://doi.org/10.1111/tpj.16612>
- Seo, P. J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.-Y., Lee, Y. N., Kim, S.-G., Lee, Y.-H., Park, W. J., & Park, C.-M. (2009). The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151(1), 275–289. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144220>
- Serraj, R., Sinclair, T., & Purcell, L. (1999). Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 50(331), 143–155.
- Sgroi, L. C., Lovino, M. A., Berbery, E. H., & Müller, G. V. (2021). Characteristics of droughts in Argentina's core crop region. *Hydrology and Earth System Sciences*, 25(5), 2475–2490. <https://doi.org/10.5194/hess-25-2475-2021>
- Shao, H., Wang, H., & Tang, X. (2015). NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00902>
- Sharma, S., Kaur, M., Goyal, R., & Gill, B. S. (2011). Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. *Journal of Food Science and Technology*, 51(3), 551–557. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0517-7>

- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2022). Functional genomics in plant abiotic stress responses and tolerance: From gene discovery to complex regulatory networks and their application in breeding. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 98(8), 470–492. <https://doi.org/10.2183/pjab.98.024>
- Shou, L., Gao, J., Yao, L., Ren, G., Zhu, X., Gao, S., Qiu, K., Zhou, X., & Benke, K. (2016). The role of ANAC072 in the regulation of chlorophyll degradation during age- and dark-induced leaf senescence. *Plant Cell Reports*, 35(8), 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1991-1>
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R. K., Roorkiwal, M., Pandey, M. K., Hu, J., Li, Y. H., Wang, L. X., Guo, Y., & Qiu, L. J. (2014). Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43–104. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>
- Song, Y.-T., Ma, K., Zhao, Y., Han, L.-Q., & Liu, L.-Q. (2024). Genome-wide identification of the walnut MYC gene family and functional characterization of Xinjiang wild walnut under low-temperature stress. *Frontiers in Genetics*, 15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2024.1399721>
- Staudinger, C., Mehmeti-Tershani, V., Gil-Quintana, E., Gonzalez, E. M., Hofhansl, F., Bachmann, G., & Wienkoop, S. (2016). Evidence for a rhizobia-induced drought stress response strategy in *Medicago truncatula*. *Journal of Proteomics*, 136, 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.006>
- Takasaki, H., Maruyama, K., Takahashi, F., Fujita, M., Yoshida, T., Nakashima, K., Myouga, F., Toyooka, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2015). SNAC-As, stress-responsive NAC transcription factors, mediate ABA-inducible leaf senescence. *The Plant Journal*, 84(6), 1114–1123. <https://doi.org/10.1111/tpj.13067>
- Tang, J., & Bassham, D. C. (2018). Autophagy in crop plants: what's new beyond Arabidopsis ? *Open Biology*, 8(12), 180162. <https://doi.org/10.1098/rsob.180162>
- Tardieu, F., Simonneau, T., & Muller, B. (2018). The Physiological Basis of Drought Tolerance in Crop Plants: A Scenario-Dependent Probabilistic Approach. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 733–759. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040218>
- Tran, L.-S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell*, 16(9), 2481–2498. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022699>
- U.S. Department of Agriculture. (2024). *List of Bioengineered Foods*. Usda.gov. <https://www.ams.usda.gov/rules-regulations/be/bioengineered-foods-list>

- United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2022). *World population prospects 2022 : summary of results*. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.
- Viola, I. L., Alem, A. L., Jure, R. M., & Gonzalez, D. H. (2023). Physiological Roles and Mechanisms of Action of Class I TCP Transcription Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5437. <https://doi.org/10.3390/ijms24065437>
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., & Makino, A. (2008). Autophagy Plays a Role in Chloroplast Degradation during Senescence in Individually Darkened Leaves. *Plant Physiology*, 149(2), 885–893. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130013>
- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., Cumming, M., Kelley, L. A., Sternberg, M. J., Krishnakumar, V., Ferlanti, E., Miller, J., Town, C., Stuerzlinger, W., & Provar, N. J. (2017). ePlant: Visualizing and Exploring Multiple Levels of Data for Hypothesis Generation in Plant Biology. *The Plant Cell*, 29(8), 1806–1821. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00073>
- Walhout, A. J. M., Temple, G. F., Brasch, M. A., Hartley, J. L., Lorson, M. A., van den Heuvel, S., & Vidal, M. (2000). [34] GATEWAY recombinational cloning: Application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods in Enzymology*, 328, 575-IN7. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)28419-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)28419-x)
- Wang, C., Linderholm, H. W., Song, Y., Wang, F., Liu, Y., Tian, J., Xu, J., Song, Y., & Ren, G. (2020). Impacts of Drought on Maize and Soybean Production in Northeast China During the Past Five Decades. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7), 2459. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072459>
- Wang, S., & Blumwald, E. (2014). Stress-Induced Chloroplast Degradation in Arabidopsis Is Regulated via a Process Independent of Autophagy and Senescence-Associated Vacuoles. *The Plant Cell*, 26(12), 4875–4888. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133116>
- Wang, Y., Yu, B., Zhao, J., Guo, J., Li, Y., Han, S., Huang, L., Du, Y., Hong, Y., Tang, D., & Liu, Y. (2013). Autophagy Contributes to Leaf Starch Degradation. *The Plant Cell*, 25(4), 1383–1399. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.108993>
- Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., Gao, H., & Mei, L. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology Open*, 7(11). <https://doi.org/10.1242/bio.035279>
- Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 209–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>
- Wilson, S., Li, D.-H., & Ruban, A. V. (2022). The Structural and Spectral Features of Light-Harvesting Complex II Proteoliposomes Mimic Those of Native Thylakoid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 13(24), 5683–5691. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.2c01019>

- Woo, H. R., Kim, J. H., Nam, H. G., & Lim, P. O. (2004). The Delayed Leaf Senescence Mutants of *Arabidopsis*, ore1, ore3, and ore9 are Tolerant to Oxidative Stress. *Plant and Cell Physiology*, 45(7), 923–932. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch110>
- Woo, H. R., Masclaux-Daubresse, C., & Lim, P. O. (2018). Plant senescence: how plants know when and how to die. *Journal of Experimental Botany*, 69(4), 715–718. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery011>
- Woodson, J. D. (2019). Chloroplast stress signals: regulation of cellular degradation and chloroplast turnover. *Current Opinion in Plant Biology*, 52, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.06.005>
- Woolhouse, H. W. (1984). The biochemistry and regulation of senescence in chloroplasts. *Canadian Journal of Botany*, 62(12), 2934–2942. <https://doi.org/10.1139/b84-392>
- Xuan, H., Huang, Y., Zhou, L., Deng, S., Wang, C., Xu, J., Wang, H., Zhao, J., Guo, N., & Xing, H. (2022). Key Soybean Seedlings Drought-Responsive Genes and Pathways Revealed by Comparative Transcriptome Analyses of Two Cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2893–2893. <https://doi.org/10.3390/ijms23052893>
- Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968–989. <https://doi.org/10.1128/mmbr.63.4.968-989.1999>
- Zhuang, X., & Jiang, L. (2019). Chloroplast Degradation: Multiple Routes Into the Vacuole. *Frontiers in Plant Science*, 10(359). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00359>
- Zuo, J., & Chua, N.-H. (2000). Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(2), 146–151. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00073-2](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00073-2)
- Zuo, J., Niu, Q.-W., & Chua, N.-H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal*, 24(2), 265–273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00868.x>