



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcienc.edu.uy



Preparando el terreno para modular la vía de vesiculación cloroplástica en soja mediante CRISPR/Cas9

Selene Briano

Tutora: Sabina Vidal

Año: 2026

Trabajo final de Grado
Facultad de Ciencias,
Universidad de la República
Licenciatura en Ciencias Biológicas



Resumen

El déficit hídrico constituye uno de los principales factores limitantes del rendimiento de la soja (*Glycine max*), particularmente en escenarios asociados al cambio climático. La senescencia foliar inducida por estrés representa un mecanismo de escape que, si bien asegura la reproducción, compromete la productividad al reducir la duración de la fase fotosintética. Estudios previos identificaron a la proteína Chloroplast Vesiculation 1 (CV1) de soja, con un rol clave en la degradación de cloroplastos durante la senescencia inducida por estrés, mostrando una correlación negativa entre su expresión y la tolerancia a la sequía. En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo generar variantes editadas del promotor de CV1 (proCV1) mediante CRISPR/Cas9, utilizando *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo heterólogo. Se diseñaron ARN guías (gRNAs) dirigidos a elementos cis-reguladores identificados *in silico* y se generaron ocho construcciones para la edición simultánea de regiones específicas del promotor. Las construcciones fueron introducidas en una línea transgénica proCV1:GUS, que permitirá evaluar el impacto de las deleciones detectadas en proCV1 evaluando la actividad del gen reportero GUS. Este trabajo propone un abordaje novedoso para identificar regiones del promotor relevantes para regular la expresión de CV1 en respuesta al estrés. A su vez, el trabajo sienta las bases para el diseño de una estrategia de modulación fina de la expresión génica basada en edición del promotor, orientada a reducir la senescencia inducida por estrés sin alterar la senescencia natural, constituyendo una herramienta potencial para el mejoramiento de cultivos frente a condiciones ambientales adversas.

Agradecimientos

Con la entrega de este trabajo tengo el enorme placer de dar por finalizada mi carrera de grado. Ha sido un camino profundamente enriquecedor, lleno de aprendizajes y desafíos que me impulsaron a crecer. Nada de esto hubiera sido posible sin el acompañamiento de muchas personas, a quienes quiero agradecer especialmente.

En primer lugar, a mi tutora, Sabina Vidal, por su guía, paciencia y confianza a lo largo de este proceso. Su acompañamiento académico y humano fue fundamental en cada etapa. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar en temas que tanto me motivan.

Al equipo de Biología Molecular Vegetal, por el apoyo constante. A las profesoras Alex, Lu, Ceci, que siempre respondieron mis mil preguntas de mesada y siguen siendo parte esencial de mi formación. A los gurises del laboratorio, tanto por las discusiones constructivas y las risas que nunca faltan. Y también a quienes ya no están en el equipo, pero cuya contribución fue igualmente importante.

A mi familia, mi sostén incondicional. A mi hermano y a mis padres, Leonardo y Claudia, por el esfuerzo, el apoyo y el impulso para animarme a dedicarme a lo que me gusta. Este logro también es de ustedes. A mis abuelas, Mabel y Sara, por el cariño, las charlas de media tarde y las viandas que acompañaron tantos almuerzos de facultad. Y a mi abuelo Camilo, cuya curiosidad y picardía recuerdo con enorme afecto.

Gracias a las personas que se volvieron familia en el camino. A Bels, mi mejor amiga y primera alumna en biología. A Deby, por el acompañamiento durante la escritura y por hacer que la portada de esta tesis sea hermosa. A Maryam, Lucía y Paula, por hacer que la Facultad se sintiera más como casa. A Sofía y Yamila, por estar cuando más las necesité, compartiendo meriendas, cenas y risas. A Ine, por las cervezas compartidas. A Pía por las tantas risas en mesada. A Abril, por ayudarme a aprobar el último examen. A Lourdes, por su entusiasmo constante. A Fabi, por los cafés y la buena energía. Y a todas las personas que estuvieron presentes en cada momento de incertidumbre.

Sin más preámbulo, doy por concluidos estos agradecimientos, esperando que el resultado final esté a la altura del apoyo recibido.

Tabla de Contenidos

Resumen.....	1
Agradecimientos.....	2
Tabla de Contenidos.....	3
1. Introducción.....	5
1.2. Cambio climático y agricultura.....	5
1.3. Importancia de la soja.....	6
1.4. Respuesta al estrés hídrico.....	7
1.5. Senescencia.....	9
1.6. Fitohormonas y senescencia.....	10
1.7. Antecedentes de resistencia al estrés abiótico y oportunidades para el mejoramiento	12
1.8. Rutas de degradación de los cloroplastos.....	13
1.9. Degradación de los cloroplastos mediada por la ruta de vesiculación cloroplástica.	14
1.10. Edición génica como estrategia emergente en el mejoramiento vegetal.....	15
1.11. Uso de CRISPR-Cas para editar promotores de genes vegetales.....	18
1.12. Antecedentes del proyecto.....	19
2. Objetivos.....	20
3. Materiales y métodos.....	21
3.1. Análisis bioinformático del promotor de GmCV1.....	21
3.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	22
3.3. Transformación de Arabidopsis thaliana.....	22
3.4. Preparación de célula electrocompetentes de E. coli TOP10 y Agrobacterium tumefaciens C58C1.....	23
3.5. Transformación de células electrocompetentes.....	23
3.6. Diseño de gRNAs y síntesis de adaptadores.....	24
3.7. Generación de construcciones génicas para expresión de gRNAs.....	24
3.8. Análisis de colonias de Escherichia coli transformantes con pENTR-TA.....	25
3.9. Generación de vectores de expresión por recombinación de los vectores entradas y el vector destino.....	26

3.10. Minipreparación de plásmidos usando Zippy Plasmid Miniprep kit.....	27
3.11. Análisis de colonias de Escherichia coli y Agrobacterium tumefaciens transformantes con vector binario.....	28
3.12. Electroforesis en gel de agarosa.....	29
3.13. Extracción de ADN genómico de líneas transgénicas de Arabidopsis thaliana.....	29
3.14. Amplificación por PCR del transgen de Cas9 en líneas transformadas.....	30
3.15. Búsqueda preliminar de líneas de Arabidopsis thaliana editadas mediante PCR de proCV1.....	31
4. Resultados.....	32
4.1. Análisis del promotor de GmCV1.....	32
4.2. Diseño de gRNAs y generación de construcciones para la edición del promotor de CV1.....	33
4.3. Transformación de Arabidopsis proCV1:GUS.....	47
4.4. Análisis preliminar de la eficacia de edición del promotor de CV1.....	50
5. Discusión.....	54
5.1. Rol de CV1 en la senescencia temprana asociada a estrés abiótico.....	54
5.2. Estrategias para interferir en la senescencia temprana.....	55
5.3. Edición de proCV1 como estrategia de intervención sobre la senescencia temprana.	56
5.4. Estructura de proCV1.....	58
5.5. Uso de un sistema heterólogo.....	60
5.6. Desafíos metodológicos y oportunidades de mejora.....	61
5.7. Un abordaje híbrido para la identificación funcional de regiones cis-reguladoras....	63
6. Conclusiones y perspectivas.....	63
Bibliografía.....	65
Anexo.....	78
Abreviaciones.....	78
Lista de cebadores utilizados en PCR.....	80
Secuencia genómica de proCV1 con los gRNAs diseñados.....	81

1. Introducción

1.2. Cambio climático y agricultura

El calentamiento global es una de las amenazas más importantes que trae consigo el cambio climático, impactando directamente en la producción agrícola, uno de los pilares más importantes de la existencia y actividad humana (Yuan et al., 2024). Tanto en ecosistemas naturales como agrícolas, plantas y animales enfrentan el desafío de soportar las condiciones climáticas que cambian más rápido de lo que su capacidad de adaptación puede permitirles (Karavolias et al., 2021).

La causa principal del cambio climático radica en la adición antropogénica de gases de efecto invernadero a la atmósfera (Karavolias et al., 2021), que se ve exacerbada debido a la gran dependencia que tiene nuestra sociedad del uso de combustibles de origen fósil (Yang et al., 2023). Debido a estas emisiones, la temperatura promedio del planeta ha aumentado casi 1°C en promedio desde 1850 (Summary for Policymakers — Global Warming of 1.5 °C, s. f.).

Pero las repercusiones de este fenómeno no se limitan únicamente al incremento de la temperatura, la cadena de efectos subsecuentes incluye la aparición de eventos climáticos extremos, tales como sequías, inundaciones e incendios, que han alcanzado niveles récord. Estos eventos han demostrado tener un impacto significativo en la productividad agrícola, además de alterar la dinámica ecológica, que juega un papel fundamental en el control de plagas y enfermedades que afectan los cultivos (Yang et al., 2023). Investigaciones recientes sugieren que el cambio climático está modificando los ciclos de vida de los patógenos, así como la resistencia de los hospedadores y la distribución de enfermedades, lo que dificulta aún más la adaptación de las estrategias de protección de cultivos frente a estos desafíos (Kumar et al., 2023).

Dentro de los tipos de estrés abiótico que afectan negativamente el rendimiento de los cultivos y que se encuentran asociados al cambio climático, están las inundaciones, las sequías, la salinidad del suelo y las temperaturas extremas (Bailey-Serres et al., 2019). En Uruguay, los cultivos de verano, como la soja, están frecuentemente expuestos a condiciones de déficit hídrico que suelen existir durante el ciclo de vida de estas plantas. Además, teniendo en cuenta el patrón actual de cambio climático, se proyecta que el estrés por sequía pueda convertirse en un factor aún más severo (Easterling et al., s. f.; Zia et al., 2021).

En este escenario, y considerando las pérdidas de rendimiento de los cultivos causadas por las sequías severas durante las últimas décadas, surge un creciente interés

en mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos cuando se enfrentan a condiciones de estrés ambiental (Rasheed et al., 2022).

Es así que emerge como enfoque prometedor, el desarrollo de cultivos tolerantes a la sequía de manera sustentable, como medio para satisfacer las demandas de una población humana en aumento, que requerirá mayores cantidades de alimento y combustible (Shi et al., 2017).

1.3. Importancia de la soja

La soja, *Glycine max* (L.) Merrill, es un cultivo oleaginoso muy importante en el país y a nivel mundial. Sus semillas son una de las principales fuentes de aceite y proteína vegetal para consumo humano y animal, así como para la producción de biocombustibles (Burriss & Roberts, 1993; Do et al., 2019). Entre las legumbres de consumo, ocupa el segundo lugar después del maní en cuanto a contenido de aceite (18–22%) y presenta el mayor contenido proteico (40–42%) en comparación con cualquier otro cultivo (Foyer et al., 2019; Michelfelder, 2009).

Respecto a su contenido proteico, la soja es considerada una fuente importante de alimento capaz de satisfacer las necesidades proteicas del cuerpo humano (Rizzo & Baroni, 2018). Además, se consolida como una fuente proteica versátil, gracias a la diversidad de alimentos que derivan de ella, como tofu, leche de soja, tempeh, salsa de soja, miso, y otros análogos cárnicos. Si bien estos productos constituyen pilares en dietas vegetarianas y veganas, donde se consideran el principal sustituto cárnico (Rizzo & Baroni, 2018), también representan alternativas nutricionalmente adecuadas y, en general, de producción más sostenible que los alimentos de origen animal («Food Use of Whole Soybeans», 2008; Sui et al., 2021).

Por otro lado, la soja es un cultivo clave para los sistemas agrícolas por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico mediante simbiosis con rizobios, lo que reduce la necesidad de fertilización nitrogenada externa (Burriss & Roberts, 1993). Esta reducción de fertilización externa, además de ser beneficiosa para el ambiente, implica un beneficio económico importante. El impacto económico de la fijación biológica de nitrógeno en cultivos de soja en Brasil fue calculado, estimándose que, los ahorros obtenidos en fertilización de nitrógeno externa para la zafra 2019-2020 fueron de 15.200 millones de USD, y la mitigación de gases de efecto invernadero para la misma zafra alcanzó 183 millones de Mg CO₂-e (megagramos de dióxido de carbono equivalente) (Telles et al., 2023).

En Uruguay, la soja representa el cultivo más importante en cuanto superficie sembrada. A modo de ejemplo, en la zafra de verano 2023/2024, se sembraron 1.522.363 hectáreas de cultivo para grano seco, de las cuales el 83% correspondió a soja. La producción de soja de esa zafra, alcanzó uno de los valores más altos registrados en series históricas, con un rendimiento de 2.507 kilogramos por hectárea. Sin embargo, el rendimiento promedio de este cultivo sigue siendo bajo en comparación con otros países productores de la región, siendo la disponibilidad hídrica la principal limitante del rendimiento. A modo de ejemplo, la zafra anterior, severamente afectada por el déficit hídrico que atravesaba el país, presentó un rendimiento promedio de 641 kilogramos por hectárea (DIEA presenta los resultados de la Encuesta Agrícola “Invierno 2024”, s. f.). Este estancamiento en el rendimiento y la vulnerabilidad frente períodos de sequía, representan un riesgo para la competitividad futura del cultivo.

Dado que la soja constituye uno de los cultivos de mayor importancia a escala mundial, ha impulsado un incremento significativo en las investigaciones dirigidas a comprender con mayor precisión los determinantes de su productividad, bajo un amplio rango de condiciones, con especial atención en aquellas inductoras de estrés.

En este contexto, y considerando el aumento proyectado en la demanda mundial de producción y consumo de soja, resulta indispensable desarrollar estrategias para aumentar la productividad así como prevenir grandes pérdidas por concepto de condiciones ambientales desfavorables para el cultivo (Ray et al., 2013).

1.4. Respuesta al estrés hídrico

La soja se cultiva principalmente en América y, al ser de secano y de verano, es, como ya se mencionó, particularmente vulnerable a la sequía (Cattivelli et al., 2008). Se considera la leguminosa más sensible a este tipo de estrés, experimentando caídas significativas de productividad frente al déficit hídrico (Charlson et al., 2009; Clement et al., 2008), y se ha demostrado que su productividad global varía en función del índice de sequías (Cattivelli et al., 2008). Esta realidad también afecta a Uruguay; por ejemplo, en el período 2020-2023 se experimentó la sequía meteorológica más importante desde 1915-1918 (*Finalizó la sequía meteorológica 2020-2023 en todo el Uruguay | Inumet*, s. f.). El Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca reportó que en la zafra 2022/2023 la cosecha de soja fue apenas una cuarta parte de la anterior, marcando el peor rendimiento desde 1998 (*El MGAP le puso números a un año terrible para la producción de soja*, s. f.). En el marco del cambio climático, resulta previsible la reiteración de situaciones similares, ya que entre sus efectos más alarmantes, se encuentra el aumento de temperatura global,

el cual, al asociarse con períodos prolongados sin lluvias, propician un aumento en la frecuencia y severidad de los eventos de sequía (Cotrina Cabello et al., 2023).

Las condiciones de déficit hídrico son comunes en áreas con lluvias irregulares y sistemas de riego limitados (Markulj Kulundžić et al., 2022). Bajo este tipo de estrés, diferentes variedades de soja exhiben respuestas variables, que abarcan una amplia gama de cambios morfológicos y fisiológicos, presumiblemente asociados a diferencias genotípicas (Board, 2013).

La forma de vida sésil que poseen las plantas, que les impide escapar de las condiciones ambientales a las que están expuestas, hace que deban adaptarse a dichas condiciones para sobrevivir (Markulj Kulundžić et al., 2022). Como respuesta a estos numerosos estímulos externos, las plantas experimentan adaptaciones fisiológicas, que a nivel molecular, implican cambios en la expresión de genes y en la actividad de proteínas, y a nivel bioquímico, implican cambios en el metabolismo, permitiéndole a la planta regular su crecimiento y desarrollo (Wolters & Jürgens, 2009).

Estos cambios que suceden en la planta, pueden clasificarse dentro de los distintos mecanismos que las plantas emplean para enfrentar el déficit de agua, como los mecanismos de evasión, tolerancia y escape (Kneebone et al., 1992; Turner et al., 2000).

Los mecanismos de evasión en plantas están orientados a conservar un alto potencial hídrico en los tejidos, mediante estrategias que optimizan la absorción de agua en la raíz y limitan su pérdida en la parte aérea. Esto incluye el desarrollo de raíces más profundas y eficientes, la reducción de la conductancia estomática, el enrollamiento o plegado de hojas, la disminución de la evaporación foliar, el aumento de la acumulación de ceras en la superficie de las hojas y la capacidad de ciertos órganos para almacenar agua (Carrow, 1996; Fang & Xiong, 2015; Manavalan et al., 2009). Todas estas estrategias apuntan a aumentar la eficiencia de absorción de las raíces al mismo tiempo que reducir la pérdida de agua por evapotranspiración de las partes aéreas.

Por su parte, los mecanismos de tolerancia permiten a la planta mantener su metabolismo a bajo potencial hídrico, mediante estrategias que reducen y reparan el daño provocado por el estrés. Estas incluyen ajuste osmótico, activación de sistemas de detoxificación de especies reactivas del oxígeno, reprogramación metabólica y regulación del crecimiento, todas orientadas a mitigar los efectos adversos de la sequía (Carrow, 1996; Fang & Xiong, 2015).

Finalmente, las estrategias de escape le permiten a la planta completar su ciclo de vida en un período más corto, para producir semillas antes de que se establezcan condiciones más severas de déficit hídrico (Mitra, 2001; Turner et al., 2000; Zentgraf et al., 2021). Estas estrategias integran mecanismos fisiológicos y del desarrollo que, en muchos casos, conducen a la aceleración del ciclo reproductivo y a la senescencia temprana (Turner

et al., 2000). Aunque este tipo de mecanismo le permita a la planta asegurar descendencia, no provee resultados satisfactorios en el sistema agrícola, ya que como compensación al acortamiento del ciclo de vida, la cantidad y la calidad de las semillas suelen disminuir, reduciendo significativamente la productividad (Zentgraf et al., 2021). De hecho, la senescencia anticipada inducida por estrés representa una de las principales causas de pérdida de biomasa durante el llenado del grano en numerosos cultivos (Reguera et al., 2013; Sade, del Mar Rubio-Wilhelmi, et al., 2017), comprometiendo el rendimiento en semillas o biomasa (Munné-Bosch, 2025; Reguera et al., 2013).

En contraste, los mecanismos de evasión y tolerancia se asocian a características de interés para el mejoramiento genético orientado a incrementar la resistencia a la sequía (Gallino et al., 2018), mientras que la activación prematura de la senescencia como mecanismo de escape, emerge como un factor determinante en la disminución del rendimiento de cultivos bajo sequía, constituyéndose en un proceso clave a abordar para mitigar las pérdidas productivas (Gregersen et al., 2013).

1.5. Senescencia

La senescencia es un programa intrínseco de las plantas, genéticamente determinado y altamente regulado, que, aunque suele describirse como la etapa final de la vida de una planta, puede darse desde etapas tempranas del desarrollo y extenderse a lo largo de todo el ciclo ontogénico (Zentgraf et al., 2021). Lejos de constituir un proceso meramente degenerativo, la senescencia cumple una función adaptativa al permitir la reutilización eficiente de recursos celulares en beneficio del desarrollo global de la planta (Humbeck, 2014).

Durante la senescencia de hojas, el tipo de senescencia de órganos más estudiado (Kim et al., 2016), la clorofila y otras macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, son degradadas, resultando en una disminución progresiva de la actividad fotosintética (Lim et al., 2007). Los nutrientes liberados son reciclados y removilizados eficientemente hacia zonas de la planta que se encuentran en crecimiento y formación, denominados órganos fosa, contribuyendo a sostener procesos de desarrollo activo (Balazadeh et al., 2010; Himelblau & Amasino, 2001; Sade, del Mar Rubio-Wilhelmi, et al., 2017).

En plantas monocárpicas en fase reproductiva (a partir de la formación de la flor), la senescencia foliar regula la asignación de recursos hacia los órganos reproductivos, siendo la semilla el órgano fosa por excelencia (Zentgraf et al., 2021). Nutrientes como el carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y potasio, provenientes de tejidos senescentes, son removilizados

para el llenado del grano, que es el que en última instancia, sirve de fuente de alimento; de aquí el impacto crítico que tiene este proceso sobre el rendimiento de un cultivo (Balazadeh et al., 2010; Humbeck, 2014; Zentgraf et al., 2021).

Entre los nutrientes reciclados, el nitrógeno representa el componente más significativo, derivando principalmente de proteínas del cloroplasto (RUBISCO: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) (Humbeck, 2014; Sade, Umnajkitikorn, et al., 2017). Los cloroplastos, que contienen más del 70% de nitrógeno de las hojas, son los primeros organelos en degradarse durante el proceso de senescencia (Buchanan-Wollaston et al., 2005; Hörtensteiner & Feller, 2002), lo que los convierte en un reservorio central de nutrientes cuya degradación sostiene la removilización hacia los órganos reproductivos (Buchanan-Wollaston et al., 2005).

La senescencia es un proceso finamente regulado que integra señales endógenas y ambientales mediante cambios en la expresión génica y en el metabolismo, transformando una hoja fotosintéticamente activa en un tejido fuente para la exportación de nutrientes (Buchanan-Wollaston et al., 2005; Humbeck, 2014). En este sentido, las fitohormonas desempeñan un papel clave en la coordinación sistémica de la degradación y la removilización de recursos, conectando la inmolación de ciertas células específicas para el beneficio total de la planta (Humbeck, 2014).

Si bien la senescencia es esencial para la adecuada formación de las semillas, su activación prematura bajo condiciones de estrés, compromete la duración de la fase fotosintética y limita la acumulación de biomasa, afectando negativamente la productividad. Se desprende de esto, una necesidad urgente de diseñar estrategias que modulen la senescencia con el objeto de mitigar el efecto del estrés en la productividad agrícola (Wang & Blumwald, 2014).

La movilización eficiente de nutrientes almacenados en los cloroplastos es crucial durante este proceso de senescencia, y por lo tanto, investigar sus vías de degradación se convierte en un blanco de estudio significativo, pudiendo ofrecer perspectivas sobre cómo interferir con la senescencia prematura inducida por condiciones adversas (Kim et al., 2016; Wang & Blumwald, 2014; Zhao et al., 2012).

1.6. Fitohormonas y senescencia

La senescencia foliar es un proceso altamente regulado por fitohormonas, que actúan como integradores de señales de desarrollo y del ambiente, particularmente bajo condiciones de estrés abiótico. Diversas hormonas, entre ellas el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA), promueven la senescencia de manera directa

o indirecta, activando programas transcripcionales asociados a este proceso (Zhao et al., 2012). En particular, el ABA ha sido identificado como una hormona clave en la inducción de la senescencia foliar, tanto por su aplicación exógena como por su acumulación endógena bajo condiciones de sequía, salinidad y bajas temperaturas, donde induce la expresión de numerosos genes asociados a senescencia (Lim et al., 2007; Zeevaart & Creelman, 1988; Zhang et al., 2012). Estas respuestas posicionan al ABA como un regulador central de la senescencia inducida por estrés abiótico (Khan et al., 2013).

El etileno constituye otro regulador positivo destacado de la senescencia foliar y de otros procesos del desarrollo, como la maduración de frutos, actuando como una señal gaseosa que permite sincronizar respuestas a nivel poblacional (Jing et al., 2005; Lim et al., 2007). En contraste, las citoquininas funcionan como reguladores negativos de la senescencia, observándose una disminución de sus niveles endógenos durante este proceso, además de su rol central en el crecimiento, la diferenciación de órganos y el desarrollo de la planta (Khan et al., 2013; Lim et al., 2007). Las auxinas, cuya forma biológicamente activa es el ácido indolacético (IAA), presentan un rol más complejo: si bien se ha observado un aumento de IAA libre en hojas senescentes, sugiriendo una posible función promotora de la senescencia natural, su acción depende fuertemente del contexto fisiológico y ambiental (Khan et al., 2013; Lim et al., 2007). En este sentido, estudios recientes en maíz demostraron que la aplicación exógena de auxina sintética (ácido naftalenacético) bajo condiciones de estrés y baja disponibilidad de nitrógeno mejora la asimilación de nitrógeno, inhibe genes asociados a senescencia y extiende el período de llenado del grano, resultando en un aumento del rendimiento (Jiang et al., 2020).

El ácido salicílico, conocido principalmente por su rol en defensa frente a patógenos biotrofos, también participa en la regulación de la senescencia, evidenciado por su acumulación en hojas senescentes y por el retraso de la senescencia en mutantes con rutas de biosíntesis de SA alteradas (Morris et al., 2000). El ácido jasmónico, por su parte, interviene en múltiples procesos del desarrollo y en respuestas a estrés abiótico y biótico, funcionando como un regulador clave de las defensas de la planta e interactuando de manera sinérgica o antagónica con otras hormonas, aunque su rol preciso en la senescencia aún requiere mayor elucidación (Ghorbel et al., 2021; Khan et al., 2013). En conjunto, estas hormonas pueden clasificarse funcionalmente como reguladores negativos de la senescencia (citoquininas, auxinas y giberelinas) o positivos (etileno, SA, JA, ABA, brasinoesteroides y estrigolactonas) (Huang et al., 2022). Más allá de su efecto individual, las fitohormonas cumplen un rol central como conectores entre señales ambientales y programas de desarrollo, modulando la senescencia foliar a través de cambios en el crecimiento, la regulación transcripcional y la integración de señales de estrés, lo cual

resulta clave para comprender la regulación génica asociada a la senescencia inducida por estrés abiótico (Huang et al., 2022).

1.7. Antecedentes de resistencia al estrés abiótico y oportunidades para el mejoramiento

Identificada la senescencia inducida por estrés como fenómeno capaz de reducir considerablemente el rendimiento de cultivos en condiciones de estrés hídrico, han surgido propuestas basadas en la manipulación de este fenómeno para interferir con esta respuesta de escape de la planta.

Un ejemplo de esto, son los genotipos “*stay-green*”. Numerosos reportes de líneas mutantes o transgénicas de diferentes cultivos con características de senescencia retardada (fenotipo *stay-green*), demuestran ser plantas *stay-green* funcionales con productividad aumentada en biomasa o grano. Esto se debe a que las características de una planta *stay-green*, permiten mantener la actividad fotosintética en las hojas luego de la floración, cualidad asociada a un aumento del rendimiento del grano en condiciones de estrés (Gregersen et al., 2013). Si bien el término *stay-green* refiere estrictamente a mutantes con el catabolismo de clorofilas alterado, es usado frecuentemente para referirse a cultivos que exhiben senescencia retardada en campo, particularmente bajo condiciones limitantes de agua (Gregersen et al., 2013; Hörtensteiner, 2009).

Para el caso de la soja, existen antecedentes de mutantes *stay-green* caracterizados que resultan ser más susceptibles al déficit hídrico que los genotipos *wild type* (WT, salvaje) (Luquez, 2001). Las líneas *stay-green* como la *Gd1d2*, tienen inhibida la degradación de clorofila asociada a la senescencia, pero su preservación en esta línea *stay-green*, no se traduce a una mejor actividad fotosintética o a una mejor tasa de crecimiento bajo condiciones normales, registrándose además, efectos pleiotrópicos en otros procesos del desarrollo que coartan cualquier posible ganancia en el rendimiento como producto de la preservación de la actividad fotosintética (Luquez, 2001).

En la búsqueda de obtener cultivos con mayor tolerancia al estrés hídrico, entre las estrategias de mejoramiento más comúnmente conocidas, se encuentra el cruzamiento entre líneas con características de interés, pero este puede ser un proceso largo y tedioso (Board, 2013). Gracias a los avances en la biotecnología, la disponibilidad de secuencias genómicas y el aumento en herramientas genómicas disponibles para la investigación, la perspectiva de transgénesis se ha vuelto una estrategia alternativa atractiva. El factor crítico para esta perspectiva de transgénesis, es poder identificar genes candidatos ideales que

puedan mejorar la tolerancia a la sequía sin comprometer negativamente el rendimiento del cultivo (Board, 2013).

Atendiendo a estos argumentos, un abordaje exitoso fue el de expresar en plantas transgénicas de tabaco, isopentil transferasa (IPT), enzima clave para la biosíntesis de citoquininas (fitohormona antagonista a la senescencia) (Rivero et al., 2007). IPT fue expresada bajo la regulación de un promotor inducible por senescencia (pSARK), generando un aumento en la estabilidad del cloroplasto, permaneciendo con un aparato fotosintético protegido (Rivero et al., 2007, 2009, 2010).

1.8. Rutas de degradación de los cloroplastos

Existen numerosos estudios que confirman la existencia de varias rutas vesiculares involucradas en la degradación de componentes del cloroplasto. Dichas vías pueden clasificarse como dependientes o independientes de genes asociados a la autofagia (Domínguez & Cejudo, 2021).

En plantas se constató que la autofagia actúa en la senescencia como respuesta a estrés biótico y abiótico (Liu & Bassham, 2012). Durante este proceso, Rubisco y otras proteínas del estroma del cloroplasto, son transportadas a la vacuola a través de los denominados cuerpos contenedores de Rubisco (RCBs). Una ruta dependiente también de genes asociados a autofagia, es la de los cuerpos asociados a plastidios que interactúan con la proteína ATG8 (Autophagy-Related Protein 8), los cuales son finalmente internalizados en la vacuola central (Michaeli et al., 2014).

Otra vía descrita, es la de las vacuolas asociadas a senescencia (SAVs), que se acumulan en células de hojas senescentes y presentan intensa actividad proteolítica (Martínez et al., 2008).

La manipulación de estas vías de degradación de los cloroplastos con el objetivo de obtener plantas con senescencia retardada, ha sido evaluada en múltiples ocasiones. Mutantes deficientes autofagia exhibieron senescencia acelerada en la mayoría de los casos, lo que impactó negativamente en el rendimiento de la planta (Li et al., 2015). Mientras que para mutantes *knockout* de la proteasa clave en las SAVs, no se logró evidenciar cambios fenotípicos en la senescencia de las plantas (James et al., 2018). En conjunto, la evidencia sugiere que interferir tanto con la autofagia como con SAVs, no brinda mejoras consistentes en la tolerancia a la sequía, lo que resulta coherente teniendo en cuenta el papel central que estas rutas tienen sobre el desarrollo y la adaptación (Domínguez & Cejudo, 2021; Jiang et al., 2020).

En el trabajo de investigación de Wang y Blumwald, se analizaron patrones de expresión de ARN (ácido ribonucleico) usando microarreglos de ADN (ácido desoxirribonucleico), en plantas WT y transgénicas de arroz, conteniendo la construcción pSARK-IPT (expresión de enzima clave para la biosíntesis de citoquinina regulada por un promotor inducible por senescencia) bajo condición de déficit hídrico (Peleg et al., 2011; Reguera et al., 2013). Este análisis evidenció la expresión de un gen codificante para una proteína del cloroplasto con función desconocida, solo en las plantas WT y no en aquellas transgénicas (Peleg et al., 2011). Se identificó el gen homólogo en *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), que tras ser clonado y caracterizado, logró ser descrito como codificante para una proteína de vesiculación cloroplástica (de allí su nombre CV: Chloroplast Vesiculation), participe en una nueva vía descubierta de degradación de cloroplastos independiente de autofagia (Wang & Blumwald, 2014).

1.9. Degradación de los cloroplastos mediada por la ruta de vesiculación cloroplástica

CVV (*chloroplast-degradation vesicular pathway*) es la ruta de degradación de los cloroplastos más recientemente descrita hasta el momento, y se probó que participa tanto en la senescencia natural como en la inducida por estrés, involucrando a una proteína llamada CV (Wang & Blumwald, 2014). Dicha proteína que tiene por blanco los cloroplastos, gracias un péptido señal en su extremo N-terminal, e induce la formación de vesículas (Wang & Blumwald, 2014). Ensayos de RT-PCR evidencia que la expresión del gen se aumenta durante senescencia y estrés abiótico, y se ve disminuída tras tratamiento con citoquinina. (Wang & Blumwald, 2014). Durante estrés, CV se acumula e interactúa con membranas tilacoidales, promoviendo la formación de vesículas que transportan proteínas cloroplásticas hacia la vacuola para su degradación, de manera independiente de la autofagia y de SAVs (Wang & Blumwald, 2014).

Se realizaron ensayos de sobreexpresión y silenciamiento del gen codificante para esta proteína (CV) *Arabidopsis*, con los posteriores análisis fenotípicos correspondientes (Wang & Blumwald, 2014). La sobreexpresión constitutiva de CV resultó letal, mientras que su sobreexpresión bajo la regulación de un promotor inducible provocó clorosis en las hojas y retardo general en el crecimiento de la planta. Bajo tratamientos de inducción del promotor, los contenidos de clorofila fueron notoriamente reducidos. En conjunto, se pudo concluir que la sobreexpresión de CV induce senescencia prematura y degradación de cloroplastos (Wang & Blumwald, 2014).

Por otra parte, el silenciamiento de CV mediante micro ARNs artificiales, no mostró alteraciones en su desarrollo ni en su senescencia natural. Se constató que bajo estrés salino y oxidativo, la degradación de cloroplastos inducida por estrés se vio inhibida. Tras tratamientos de sequía, la tasa de sobrevivencia de las plantas con CV silenciado, fue significativamente mayor que las plantas WT. Estos resultados indican que el silenciamiento de CV, aumenta la estabilidad de los cloroplastos mediante la prevención de la senescencia inducida por estrés (Wang & Blumwald, 2014). Estudios más recientes realizados en tomate, concluyen que la falta de función de CV por *knockout*, contribuye al mantenimiento de la capacidad fuente bajo senescencia inducida por estrés (Ahouvi et al., 2022).

En trabajos previos del grupo de Biología Molecular Vegetal, se compararon genotipos de soja con fenotipos contrastantes frente a sequía (Gallino et al., 2018; Fleitas et al., 2023). Un genotipo es el cultivar N7001, con fenotipo de marchitamiento lento y tolerancia al estrés hídrico (Carter et al., 2003). El otro genotipo es TJS2049, considerado altamente sensible al déficit hídrico (Pardo et al., 2015).

Se analizó la respuesta molecular y fisiológica de los dos genotipos bajo condiciones de sequía y se identificaron genes expresados diferencialmente entre ambos, incluyendo genes de la ruta CVV (Fleitas et al., 2023; Gallino et al., 2018). En ambos genotipos, bajo sequía, la expresión de genes CV fue alta, sugiriendo que esta vía desempeña un rol clave en la respuesta al estrés hídrico. Sin embargo, la inducción de genes CV fue mayor en los genotipos sensibles, lo que demuestra una correlación negativa entre su expresión y la tolerancia a la sequía (Fleitas et al., 2023).

En soja existen dos genes parálogos: CV1 y CV2, que contribuyen de forma diferente a la senescencia inducida por estrés y a la senescencia natural. CV1 es más relevante en la respuesta al estrés, mientras que CV2 actúa principalmente en procesos de senescencia natural (Fleitas et al., 2023). Esta especialización funcional permite desarrollar estrategias para aumentar la tolerancia al déficit hídrico sin alterar la senescencia natural.

Dado lo anterior, el gen CV1 se destaca como blanco prometedor para incrementar la tolerancia al estrés mediante estrategias que disminuyan su inducción frente al déficit hídrico.

1.10. Edición génica como estrategia emergente en el mejoramiento vegetal

Como se introdujo previamente, el rendimiento en los cultivo es una característica cuantitativa compleja, que depende tanto de factores ambientales como de una gran

cantidad de genes, algunos de los cuales son clave para ciertas características agronómicas deseables, pero que se han ido perdiendo durante el proceso de domesticación (Chakraborty et al., 2014; Tang et al., 2023).

Los métodos tradicionales de mejoramiento de cultivos, ya sea por el cruzamiento u obtención de inducción de mutaciones, han logrado aumentar su rendimiento considerablemente, pero actualmente enfrenta muchas limitaciones debido a la falta de germoplasma natural valioso, la incorporación de regiones genómicas no deseadas, y el tiempo requerido para el proceso de *screening* (Razzaq et al., 2021; Tang et al., 2023).

Las mutaciones han sido y continúan siendo la base para la creación de nuevos recursos genéticos en el mejoramiento vegetal (Tang et al., 2023). El aprovechamiento de variaciones naturales se remonta al 300 a.C., cuando las sociedades humanas utilizaban mutaciones espontáneas en la naturaleza para el cruzamiento selectivo. Se estima que los humanos hemos estado mejorando cultivos desde hace más de 10 mil años, desde el momento en el que semillas de plantas con características favorables fueron guardadas para ser sembradas la siguiente temporada, naciendo así la práctica conocida como domesticación (Lee et al., 2015; Permyakova et al., 2024).

Si bien la mutagénesis inducida ha sido ampliamente usada para modificar el genoma de plantas, la forma tradicional de mutagénesis aleatoria y posterior selección, resulta laboriosa y a veces ineficiente (Ma et al., 2015; Permyakova et al., 2024).

Es así que el uso de herramientas biotecnológicas como la transgénesis, la selección asistida por marcadores y la edición genética, por mencionar algunas, proporcionan nuevas alternativas para el mejoramiento de cultivos. (Razzaq et al., 2021)

La transgénesis en plantas ha ciertamente abierto las puertas a una nueva era en la agricultura y mejoramiento de cultivos, no obstante, la opinión pública y las preocupaciones sobre los organismos genéticamente modificados, significó un enlentecimiento en el avance de esta tecnología, habiéndose incluso detenido su implementación en algunos países (Permyakova et al., 2024).

Frente a estos desafíos, el uso de edición génica o ingeniería genética, se posiciona como un método para auxiliar la adaptación de los organismos al cambio climático y mitigar los efectos de estos cambios en la agricultura, como una forma de generar variación genética introduciendo mutaciones dirigidas, y también como un mecanismo de silenciamiento génico que presenta mejor aceptación social y regulatoria que la transgénesis (Ahmad, 2023; Karavolias et al., 2021; Mishra & Pandey, 2024).

Mientras que las técnicas de silenciamiento génico basadas en transgénesis presentan desafíos regulatorios para la comercialización de cultivos, la edición génica por metodologías como nucleasas de dedo de zinc (ZFN), nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN) y repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y

regularmente interespaciadas (CRISPR), destacan por su eficiencia y versatilidad (Tang et al., 2023).

La tecnología CRISPR-Cas9, ha revolucionado el mejoramiento vegetal y ofrece herramientas concretas para una agricultura más sostenible hacia el 2050 (Ahmad, 2023; Mishra & Pandey, 2024). Los productos generados con esta tecnología ganan reconocimiento gracias a marcos más permisivos (Ahmad, 2023). En muchos casos, la edición genética puede lograr los mismos resultados que se obtienen mediante transgénesis pero con menor impacto en el genoma de la planta, y generalmente también a menor costo (Permyakova et al., 2024). La precisión y eficiencia de generación de editados ha aumentado notablemente gracias a la introducción de este sistema (Karavolias et al., 2021).

CRISPR-Cas9 se desarrolló a partir de mecanismos inmunitarios de procariontes frente a ácidos nucleicos invasores (Ishino et al., 1987; Jinek et al., 2012; Pacesa et al., 2024). En su aplicación biotecnológica, utiliza la endonucleasa Cas9 para inducir cortes específicos en la doble hebra de ADN, esto puede disparar dos tipos diferentes de rutas de reparación del ADN: unión de extremos no homólogos, o recombinación homóloga, lo que generalmente resulta en pequeñas o grandes mutaciones. La especificidad del sistema está determinada un ARN guía (gRNA), permitiendo editar prácticamente cualquier región del genoma. En plantas, se suele introducir el sistema mediante construcciones génicas que posibilitan su expresión intracelular. Estas líneas atraviesan etapas transgénicas, pero existen estrategias para eliminar los transgenes, facilitando el análisis y la regulación de cultivos editados (Fauser et al., 2014; He et al., 2022).

El sistema CRISPR-Cas9 está compuesto entonces por dos componentes: el gRNA y la endonucleasa Cas9, siendo la más usada, la que deriva de *Streptococcus pyogenes*. La Cas9 tiene dos dominios, el HNH y el RuvC-like. El dominio HNH corta la hebra complementaria al gRNA, mientras que el otro dominio se encarga de clivar la otra hebra del ADN. El gRNA tiene en su extremo 5' una secuencia de 20 nucleótidos que dirige el reconocimiento a la secuencia blanco a ser editada, la cual debe ser adyacente a un motivo PAM (Proto-Adjacent Motif), que para la Cas9, es "NGG". La estructura en loop hacia el extremo 3' del gRNA, actúa de ancla (*scaffold*) para formar el complejo con la Cas9, que cortará la doble hebra de ADN a 3 nucleótidos hacia el 5' de la secuencia PAM ubicada en el ADN a editar. Tras el corte, la reparación por unión de extremos no homólogos puede generar inserciones o deleciones que conduzcan, por ejemplo, a la pérdida de función génica (Liu et al., 2017).

La versatilidad, precisión y eficiencia de este sistema, y los avances hechos para su aplicación, proveen oportunidades sin precedentes, para análisis de función génica, creación de germoplasmas deseables en diferentes cultivos y el desarrollo de cultivos que pueden manejar mejor las imposiciones del cambio climático; abriendo las puertas a lo que

muchos autores llaman, la tercera revolución verde de la agricultura (Adeyinka et al., 2023; Fernie & Yan, 2019; Karavolias et al., 2021).

1.11. Uso de CRISPR-Cas para editar promotores de genes vegetales

Dos de los principales obstáculos del mejoramiento de cultivos, son las limitadas fuentes de variación genética detrás de las características cuantitativas (como lo es el rendimiento del cultivo), y el intenso y laborioso trabajo requerido para caracterizar fenotípica y molecularmente las plantas para la selección de aquellas con mejoras. La forma en la que se ha obtenido variaciones genéticas y fenotípicas para el mejoramiento de cultivos, ha sido el cruzamiento con parientes *wild type* para introducir diversidad alélica “exótica”, o creando alelos nuevos por mutagénesis e ingeniería genética (Wang et al., 2017; Zamir, 2001). Pero estos métodos han demostrado ser poco eficientes para proporcionar variantes que generen cambios sutiles en características cuantitativas, las cuales son las más deseadas por los mejoradores (Rodríguez-Leal et al., 2017).

A medida que la edición genética de plantas aumenta, investigadores exploran la estrategia de edición de promotores para estudiar la diversidad funcional y crear nuevos recursos de germoplasma con rasgos cuantitativos polimórficos, e incluso rasgos completamente nuevos basados en los mismos loci mediante una fina regulación de la expresión genética (Tang & Zhang, 2023).

En comparación con las mutaciones en secuencias codificantes que alteran la estructura de las proteínas, las variantes en regiones ricas en elementos cis-reguladores (CRE: Cis Regulatory Element) son frecuentemente menos pleiotrópicas y a menudo causan cambios fenotípicos sutiles al modificar el momento, el patrón o el nivel de expresión genética (Rodríguez-Leal et al., 2017; Wittkopp & Kalay, 2012). Esto se explica en la complejidad del control transcripcional, que suele ser redundante por una organización modular de los CREs (Cameron & Davidson, 2009; Priest et al., 2009; Schwarzer & Spitz, 2014).

Mientras que el *core* del promotor se une a la ARN polimerasa y a factores de transcripción generales para definir el sitio de inicio de la transcripción e iniciar la expresión basal del gen, los CREs río arriba son sitios de unión de factores de transcripción gen-específicos, brindando una regulación precisa de la expresión génica (Chandra et al., 2021; Xiao et al., 2022). Los CREs son por ende, secuencias no codificantes de ADN que comprenden varios sitios de unión a factores de transcripción u otras moléculas

regulatorias, afectando así la transcripción, y pudiendo regular el crecimiento y desarrollo de la planta, así como la diferenciación celular y la respuesta al estrés (Lu et al., 2018).

Aunque son ampliamente favorecidas en la evolución y domesticación, las variantes cis-reguladoras están lejos de estar saturadas y, por lo tanto, representan un recurso sin explotar para expandir la diversidad alélica. No obstante, las consecuencias fenotípicas de mutaciones en regiones reguladoras suelen ser más difíciles de predecir que aquellas en regiones codificantes (Wittkopp & Kalay, 2012). La expansión de la variación cis-regulatoria es prometedora no sólo para el mejoramiento de los cultivos, sino también para dilucidar los principios subyacentes al control de los caracteres cuantitativos (Rodríguez-Leal et al., 2017).

Existe un creciente reconocimiento en que obtener mutantes de promotores genéticos, resulta tan relevante como la modificación de las regiones codificantes para el estudio funcional y la mejora de cultivos (Tang & Zhang, 2023). Se ha descrito la importancia de los factores de transcripción como una herramienta moderna para mejorar la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estrés abiótico (Hajibarat & Saidi, 2022).

1.12. Antecedentes del proyecto

El Laboratorio de Biología Molecular Vegetal ha optimizado el uso de CRISPR-Cas9 en soja y lo emplea rutinariamente para generar mutaciones en su genoma y en otras especies. Hasta ahora, esta tecnología se ha usado principalmente para editar regiones codificantes de genes blanco, pero en este trabajo se propone modificar regiones específicas del promotor de *CV1* (proCV1) para lograr una modulación fina de su expresión mediante la edición de elementos cis reguladores. A diferencia de los enfoques que generan mutantes *knockout*, esta estrategia busca crear mutantes *knockdown*, reduciendo la expresión génica mediante la edición de CREs vinculados al estrés, evitando así solamente la activación del proCV1 ante ciertos estímulos.

La modificación de CREs mediante CRISPR-Cas9 puede potencialmente ampliar la diversidad genética de forma cuantitativa y cualitativa, superando limitaciones genéticas actuales (Saeed et al., 2022). La edición de promotores, aún poco explorada pero de gran potencial, permite ajustar con precisión los niveles de expresión génica y obtener alelos con variación gradual en rasgos de interés (Rodríguez-Leal et al., 2017). Además, permitirá comprender mejor el aporte funcional de distintas regiones de proCV1.

Actualmente, el enfoque más sencillo para editar promotores vegetales consiste en utilizar Cas9 dirigida a un sitio específico, seguido del *screening* de la progenie para detectar mutaciones deseadas generadas por el proceso endógeno de reparación de la

unión NHEJ. Sin embargo, este enfoque podría no alterar significativamente la función del promotor, ya que la edición mediada por Cas9, puede generar mutaciones de pocos pares de bases o pequeñas *indels* (inserciones o deleciones), lo que resulta en una baja eficiencia para obtener eventos de edición no-silenciosos que alteren la expresión del gen diana. En cambio, usando más de un gRNAs simultáneamente, se pueden obtener grandes deleciones o combinaciones de eventos de edición, es una estrategia alternativa más eficiente (Liu et al., 2021; Rodríguez-Leal et al., 2017).

En un trabajo anterior (Fleitas et al 2023), se generó una línea transgénica de *Arabidopsis* que expresa el gen reportero GUS bajo la regulación del promotor de CV1 de soja. Esta línea permitió determinar de manera precisa la actividad espacio temporal del promotor a lo largo del desarrollo así como en respuesta a distintos factores de estrés así como frente al tratamiento con diversas fitohormonas. Este material vegetal (proCV1-GUS), representa el punto de partida del presente trabajo.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el de generar variantes editadas del promotor de CV1 de soja, *in vivo*, usando CRISPR-Cas9 y *Arabidopsis thaliana* como sistema de expresión heteróloga.

Este objetivo tiene por meta a largo plazo, generar un sistema para evaluar la función de distintas regiones del promotor de CV1, en la regulación de dicho gen en respuesta al estrés abiótico. De esta manera, se busca generar conocimiento para diseñar estrategias para reducir la senescencia mediada por CV1, inducida por estrés abiótico a través de disminuir la actividad del promotor de uno de los genes claves en este proceso.

Objetivos específicos

- Diseñar ARNs guía (gRNAs) para editar distintas regiones del promotor de CV1 en base a la presencia de elementos cis reguladores (CREs) en su secuencia.
- Generar un conjunto de construcciones génicas que permitan expresar simultáneamente e *in vivo* dos gRNAs que reconozcan secuencias flanqueando CREs de interés.
- Transformar con las construcciones generadas, una línea de *Arabidopsis thaliana* transgénica que expresa el gen reportero *GUS* bajo la regulación del promotor de CV1 de soja.
- Seleccionar líneas que hayan incorporado las distintas construcciones para edición del promotor.

3. Materiales y métodos

3.1. Análisis bioinformático del promotor de *GmCV1*

Para la identificación de elementos de respuesta en la secuencia del promotor, se consideraron 1500 pares de bases río arriba desde el sitio de inicio de la traducción del gen. Dicha identificación fue realizada empleando el software PlantPan 4.0 (Chow et al., 2024) y PlantCARE (Rombauts et al., 1999), disponibles online. Para ello, se utilizó 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.

3.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se cultivó *Arabidopsis thaliana* Col-0 silvestre y *Arabidopsis thaliana* transgénica conteniendo el gen reportero GUS (β -glucuronidasa) bajo el control del promotor de GmCV1 (proCV1:GUS) (Fleitas et al. 2023). Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se esterilizaron superficialmente mediante uso de hipoclorito de sodio. En un tubo tipo Eppendorf, se sumergieron las semillas en EtOH 70% por 5 minutos y luego de retirar el EtOH, se agregó una solución de hipoclorito de sodio 25 g/L, Tritón X-100 0,1%, H₂O Mili-Q. Las semillas fueron incubadas con la solución de esterilización durante 15 minutos con agitación, para luego ser enjuagadas al menos 4 veces con H₂O Mili-Q estéril en flujo laminar.

Luego del tratamiento de esterilización superficial, las semillas fueron sembradas en placas de Petri con medio MS (Murashige y Skoog) a la mitad de concentración ($\frac{1}{2}$ MS: 2,1 g/L medio MS, pH 5,7, 0,5 % agar), e incubadas a 4°C por 48 horas para su estratificación. Posteriormente, las placas fueron colocadas en la cámara de crecimiento *in vitro* bajo lámparas LED con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, y fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, a 24°C, durante una o dos semanas. Las plántulas germinadas fueron trasplantadas a macetas con turba (Kekkila), en la cámara de crecimiento en tierra, con mismo fotoperíodo y temperatura. Se las regó periódicamente con agua destilada, y fertilizó semanalmente con NPK (18-18-18) (Hakaphos rojo) 1 g/L. Las plantas que fueron utilizadas para su transformación, fueron podadas periódicamente para cortarlas inflorescencias primarias a modo de favorecer el desarrollo de un mayor número de botones florales.

3.3. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Para cada construcción (AG, BH, CH, CI, DI, DK, EJ, JJ, VACÍO) se transformaron al menos 5 macetas con 4 plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 proCV1:GUS (Fleitas et al., 2023), mediante el protocolo de inmersión floral descrito por Clough & Bent, 1998. La transformación se llevó a cabo una vez que las plantas alcanzaron gran cantidad de botones florales, efectuándose 4-5 veces, cada 2 o 3 días. Se crecieron cultivos de 15 mL de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con los vectores binarios en medio YEP con rifampicina, espectinomicina, y carbenicilina a 100 µg/mL. Los mismos crecieron ON, 28°C a 200 rpm hasta alcanzar una OD_{600 nm} aproximada de 2.

El cultivo fue posteriormente centrifugado a 3000 g durante 10 minutos, y el pellet obtenido se resuspendió en 15 mL de solución de infiltración (MS 1/2 2,2 g/L, sacarosa 50 g/L y detergente Silwett-L77 0,05 %). La solución obtenida fue aplicada de a gotas en cada botón floral de la planta, luego se dejó cubierta con una lámina de plástico ON para evitar la rápida evaporación.

3.4. Preparación de célula electrocompetentes de *E. coli* TOP10 y *Agrobacterium tumefaciens* C58C1

Se empleó el protocolo de preparación de células electrocompetentes descrito por Miller & Nickoloff (1995), para preparar células electrocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 y de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1.

Se inocularon 500 ml de medio LB baja sal (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 0,5 g/L NaCl, H₂O Mili-Q) con 5 ml de un cultivo fresco de *E. coli* TOP10 crecido ON. Se creció el inóculo a 37°C, 300 rpm hasta alcanzar OD_{600 nm} de 0,5 - 0,7. Se enfrió el cultivo por 20 minutos en hielo y el resto del protocolo se realizó manteniendo las células y la solución de glicerol a temperaturas cercanas a 0°C. Se centrifugó el cultivo a 4°C, 4000 g, 15 minutos, en botellas de centrifuga de 200 ml. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 500 mL de una solución 10% glicerol y H₂O Mili-Q. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y descartar el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 250 ml, repitiéndose el paso de centrifugado, y volvió a resuspender el pellet, esta vez en 20 ml de la solución de glicerol 10% y H₂O Mili-Q. Tras centrifugación y resuspensión del pellet en 2 ml, la suspensión final de células se fraccionó en alícuotas de 50 µl en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Los mismos fueron inmediatamente enfriados en nitrógeno líquido y luego almacenados en freezer a -80 °C hasta su uso.

3.5. Transformación de células electrocompetentes

La transformación se realizó usando el equipo de electroporación Gene Pulser XCell de Biorad. Se esterilizaron las celdas con EtOH 70%, se lavaron con H₂O Mili-Q y se dejaron secar. En la celda enfriada en hielo, se colocó la alícuota de células electrocompetentes (50 µl) con su respectiva cantidad de plásmido a transformar (1-2 µl). Se transformó *Escherichia coli* y *Agrobacterium 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 (10 g extracto de levadura, 10 g peptona, 5 g NaCl, se llevó a 1L con agua destilada) (en caso de *A. tumefaciens*) y temperatura adecuada de crecimiento (37 °C para *E. coli* y 28 °C para *A. tumefaciens*). Finalmente, se plaquearon los 250 µL de cultivo recuperado en una placa de LB agar con el agente de selección correspondiente (kanamicina 50 µg/mL para *E. coli* o rifampicina, espectinomicina, y carbenicilina a 100 µg/mL para *A. tumefaciens*) durante 24 horas a temperatura adecuada.

3.6. Diseño de gRNAs y síntesis de adaptadores

Para el diseño de gRNAs se utilizó Chopchop (Labun et al., 2019), Crispor (Concordet & Haeussler, 2018) y CrisprP v2.0 (Lei et al., 2014) y se eligieron 10. Los vectores entrada pMR218 y pMR299, tienen un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *BbsI*, que se usó para el clonado de los gRNAs como adaptadores (TA: *target adaptor*). La enzima *BbsI* reconoce la secuencia 5'-GAAGAC-3' / 3'-CTTCTG-5'. Al ser una endonucleasa tipo IIS, es realizado por fuera de la secuencia de reconocimiento. Se requieren dos sitios de reconocimiento cercanos para que la enzima pueda dimerizar y volverse activa. En la hebra 5'→3' el corte es realizado dos nucleótidos hacia el 3' del sitio de reconocimiento (5'-GAAGACNN / N-3'), y en la hebra 3'→5' el mismo sucede a 6 nucleótidos hacia el 5' de la secuencia de reconocimiento (3'-CTTCTGNNNNNN / N-5'). Este corte deja extremos cohesivos de 4 pb en el plásmido, cuya secuencia es conocida. A los gRNAs elegidos, se les agregó secuencias protruyentes (*overhangs*), complementarias a las generadas en el plásmido tras la digestión. Los TA para clonar los gRNAs se sintetizaron de la siguiente manera (Tabla 5):

Secuencia sentido (Fw: *forward*): 5'-ATTG + secuencia de gRNA-3'

Secuencia antisentido (Rev: *reverse*): 5'-AAAC + secuencia de gRNA-3'

Los TA se prepararon hibridando los oligonucleótidos sintetizados: 1 µl de cada oligonucleótido (fw y rev) a partir del *stock* 100 µM y 48 µl de agua MQ, que se incubó a 95°C en termociclador durante 5 min y luego a temperatura ambiente por 20 min.

3.7. Generación de construcciones génicas para expresión de gRNAs

Se utilizó un sistema de vectores basado en la tecnología GATEWAY (Hartley, 2000; Katzen, 2007) para generar las construcciones finales de transformación de plantas. La secuencia para la expresión de gRNAs fueron clonada en forma de adaptadores vía restricción en los vectores de entrada pMR299 (L1-R5) y el pMR218 (L5-L2) (Ritter et al., 2017; Swinnen et al., 2022). Estos vectores son derivados de pEn-Chimera (L1-L2) (Fauser et al., 2014) y contienen el gen de resistencia a kanamicina y sitio de restricción para la enzima *BbsI* en donde se clonan los adaptadores. Los vectores fueron seleccionados por contener secuencias attL/attR flanqueando los módulos de expresión de los distintos gRNAs, de forma tal de favorecer una recombinación secuencial de ambos vectores con el vector binario de destino pMR285 (Fauser et al., 2014; Ma et al., 2015; Ma & Liu, 2016).

Para clonar la secuencia de los gRNAs en forma de adaptadores, los plásmidos entrada fueron digeridos con la enzima de restricción *BbsI* (NEB) siguiendo las indicaciones brindadas por su proveedor: 2 µg de plásmido, Buffer Cut Smart 1X, *BbsI* 2ul (20U, siendo 1U la cantidad de enzima necesaria para digerir 1 µg de ADN λ en 1 hora a 37 °C en un volumen de reacción total de 50 µl), llevar la reacción a 100 µl con agua. Incubar a 37 °C al menos 1h.

Los plásmidos digeridos fueron purificados utilizando el kit Zippy de Zymo Research siguiendo las instrucciones indicadas en el protocolo incluido en el Kit. Brevemente, a los 100 µL de digestión, se le agregó 200 µl de DNA Binding Buffer, agitando con vortex brevemente, y la solución fue transferida a la columna y centrifugada por 30 segundos a 12.000 g. La fracción no retenida (*flow through*) fue descartada y a la columna se le adicionó 200 µl de DNA Wash Buffer, centrifugando nuevamente en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se repitió el paso de lavado nuevamente y el ADN fue eluido en 22 µl de Buffer de elución. La concentración del plásmido digerido fue determinada con espectrofotómetro de microvolumen tipo NanoDrop a 260 nm.

Las reacciones de ligación de los distintos adaptadores con los vectores pMR299 y pMR218 linealizados fueron realizadas con las siguientes condiciones: en un tubo tipo Eppendorf, se colocó 20 ng de vector de entrada lineal, 3 µl de adaptador (oligos hibridados de *stock* 2 µM), 0,2 µl de ADN Ligasa T4 (5 Weiss U/ul de Thermo Scientific, EL0011), 1 µl de Buffer de ADN Ligasa T4 10X, y se llevó el volumen a 10 µl con agua MQ estéril. Se incubó a 22°C toda la noche (ON: overnight). Se inactivó la ligasa al día siguiente incubando 10 minutos a 65°C. Los productos de ligación fueron posteriormente introducidos en células de *Escherichia coli* TOP 10 mediante electroporación.

3.8. Análisis de colonias de *Escherichia coli* transformantes con pENTR-TA

Se utilizó la cepa TOP 10 de *E. coli* para introducir los productos de ligación, usando el protocolo de electroporación descrito más adelante. Las células electroporadas fueron recuperadas y plaqueadas (100 μ l) en placas de Petri con medio LB (5 g NaCl, 10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 15 g bacto agar, se llevó a 1 L con agua destilada) con kanamicina (50 μ g/ml) e incubadas ON a 37°C. Se estriaron 16 colonias de cada placa para proceder con el chequeo de presencia de plásmido conteniendo TA mediante PCR de colonias.

Como primer sentido (Forward: Fw), se utilizó el "M13F-40" (5' - GTTTTCCCAGTCACGACG - 3'), y como primer antisentido (Reverse: Rev) se usó el primer antisentido del adaptador específico presente en la construcción a analizar. Se realizaron controles con vector de entrada sin adaptador. Las reacciones se montaron según las instrucciones brindadas por el proveedor de la Polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific, Cat. No. EP0701), en un volumen final de 20 μ l: 1X DreamTaq Buffer, Mix de dNTPs a 0,2 mM cada uno, primers a 0,1-1 μ M cada uno, molde de ADN 10pg-1 μ g, Dream Taq (5U/ μ l) 1.25U, agua. El amplicón esperado en el caso del vector pMR299 era de 252 pb, y en el caso del vector pMR218, era de 475 pb.

Tabla 1. Condiciones de PCR para determinación de la presencia del adaptador en las construcciones en vectores de entrada.

Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	x1
Desnaturalización	95 °C	30 s	x35
Hibridación	Tm - 5 °C	30 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	10 min	x1

Como molde para la PCR se hizo un lisado de las colonias de *E. coli* a chequear. Con puntas de pipeta automática de 10 μ l, se tocaron las distintas estrías y las bacterias se resuspendieron en 20 μ l de agua MQ en tubos tipo Eppendorf. Los tubos se incubaron a 95°C por 5 minutos, transferidos a 0°C (hielo) y centrifugados durante 1 minuto a 12.000 g. Para la reacción de PCR se utilizó 1 μ l del sobrenadante del lisado como molde.

3.9. Generación de vectores de expresión por recombinación de los vectores entradas y el vector destino

El plásmido de destino usado es el pMR285 (attR1-attR2), el cual deriva del pDe_CAS9 (Fauser et al., 2014). Contienen el gen de resistencia a espectinomicina para su selección en bacteria, y el gen de resistencia a higromicina para su selección en planta; además de contener la secuencia nucleotídica de la Cas9 con codones optimizados para *Arabidopsis*.

La recombinación LR de los vectores entrada fue realizada por Gateway™ LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix, entre pMR285, pMR218-TA y pMR299-TA.

Se siguió el protocolo de las instrucciones indicadas por el proveedor. La reacción se hizo a volumen final de 5 µl, y se calcularon los volúmenes a tomar de plásmidos purificados de forma tal de usar 10 fmoles de cada uno de los pENTR, y 20 fmoles del pDEST. Se agregaron los plásmidos y agua a temperatura ambiente. La LR Clonasa se descongeló en hielo por aproximadamente 2 minutos, y vortex brevemente. Luego se agregó 1 µl de la enzima a cada una de las reacciones, se mezcló por vortex y dió un spin. Se incubó a 25°C por 16 h. Posterior a esto se agregó 0,5 µl de Solución de Proteinasa K (NEB) para finalizar la reacción, se mezcló e incubó a 37°C por 10 minutos.

3.10. Minipreparación de plásmidos usando Zippy Plasmid Miniprep kit

La extracción de ADN plasmídico de las bacterias usadas se realizó usando el kit de Zymo Research, Zippy Plasmid Miniprep kit (Cat. No. D4036), siguiendo las instrucciones del protocolo incluido en el kit.

Se agregó 1,5 mL de cultivo a un tubo de microcentrífuga, se centrifugó por 30 segundos a máxima velocidad y descartó el sobrenadante. Se agregaron otros 1,5 mL al tubo para volver a centrifugar y se resuspendió el pellet en 600 µL de H₂O Mili-Q. Se agregó 100 µL de Buffer de Lisis 7X (azul) y mezcló invirtiendo 4 - 6 veces, virando de un azul opaco a un azul claro, el cual indica una lisis completa. A los 2 minutos de agregado el Buffer de Lisis, se agregó 350 µL de Buffer de Neutralización (amarillo, y conservado a 4°C) y mezcló invirtiendo hasta que se formó un precipitado color amarillo claro. Se centrifugó a 11.000 - 16.000 x g por 2 - 4 minutos y se transfirió el sobrenadante a una columna Zymo-Spin™ IIN. Centrifugando por 15 segundos a 11.000 se descartó el líquido que fluyó a través de la columna y quedó en el tubo colector. A la columna se le agregó 200 µL de Buffer de Endo Lavado, y se centrifugó por 30 segundos. Se le agregó a la columna Buffer

de Lavado Zyppe™, 400 µL y se centrifugó por 1 minuto. La columna se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL nuevo, con 60 µL de H₂O Mili-Q estéril, se incubó a TA por minutos y se eluyó el ADN plasmídico centrifugando a 11.000 x g por 30 segundos. Se mide en espectrofotómetro de microvolumen tipo NanoDrop la concentración de ADN en la elución.

3.11. Análisis de colonias de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* transformantes con vector binario

Se realizó PCR de colonias de *E. coli* transformantes con los vectores binarios generados con combinaciones distintas de gRNAs. Para las construcciones AG, BH, CH, CI, DI, DK y EJ, se usaron de cebadores ambos oligonucleótidos de los dos gRNAs presentes en cada una. (Tabla 5; Tabla Anexo) Para la construcción JJ, se utilizó el cebador “HSPTerFw” (5´ - CAAATAAATAGCTTGTGTGCTTAAGTTTGTG - 3´) y el reverso del oligonucleótido J. Las reacciones se montaron según las instrucciones brindadas por el proveedor de la enzima Polimerasa Dream Taq de Thermo Scientific, brindadas por el proveedor de la Polimerasa Dreamtaq (Thermo Scientific, Cat. No. EP0701), en un volumen final de 20 µl: 1X DreamTaq Buffer, Mix de dNTPs a 0,2 mM cada uno, primers a 0.1-1 µM cada uno, molde de ADN 10pg-1µg, Dream Taq (5U/µl) 1,25U, agua. Se realizaron los controles usando de ADN molde el plásmido pMR285 (sin recombinar).

Tabla 2. Condiciones de ciclado para PCR de verificación de presencia de pEXP en colonias de *E. coli* y *Agrobacterium transformadas*.

Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	x1
Desnaturalización	95 °C	30 s	x35
Hibridación	Tm - 5 °C	30 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	10 min	x1

La verificación de la presencia de estas construcciones en *Agrobacterium* luego de su transformación, se realizó exactamente con las mismas reacciones de PCR de colonias, mismos pares de cebadores a usarse por construcción y mismo programa de ciclado. Para la cepa transformada con pMR285 sin recombinar (VACÍO), como no contiene los cassettes

de expresión de gRNAs, se elige otro par de cebadores presentes en el plásmido: “HSPterFw” e “HygRev” (5´ - GATGTTGGCGACCTCGTATT - 3´). La temperatura de hibridación utilizada fue de 53°C.

Para aquellas colonias positivas de *E.coli*, se les extrajo ADN plasmídico y se lo envió a realizar secuenciación Sanger a MacroGen, conjuntamente con el cebador HSPterFw. Los resultados fueron evaluados en el programa BioEdit para la alineación de las secuencias. Las cepas cuya secuencia de vector binario fue correcta, fueron almacenadas a -80°C en glicerol. Para ello se crecieron cultivos de cada cepa de *Agrobacterium* en medio LB con selección (rifampicina, espectinomicina y carbenicilina) a 28°C ON hasta alcanzar OD600 nm igual o superior a 1. Se preparan en tubos de microcentrifuga estériles, 700 µl del cultivo bacteriano crecido, con 300 µl de glicerol al 80%, para obtener las bacterias en una concentración final de glicerol cercana al 25%.

3.12. Electroforesis en gel de agarosa

Los geles se prepararon a una concentración del 1% de agarosa, en buffer TAE 1X (tris 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM) y usando bromuro de etidio 0,05 µg/mL como agente intercalante. Una vez solidificado el gel, se montó en una cuba electroforética con buffer TAE 1X y se corrieron las muestras junto con un marcador de peso molecular (ADN del fago Lambda digerido con la enzima *Pst*I). Los resultados luego de la corrida se observaron bajo luz UV en transiluminador.

3.13. Extracción de ADN genómico de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de ADN genómico de las plantas transformadas con las construcciones generadas, se utilizó el kit de Qiagen, DNeasy® Plant Mini Kit (Cat. No. 69106).

Se colectó 80 mg aproximadamente de material vegetal, obtenido de hojas nuevas de plantas con alrededor de dos semanas de crecimiento en turba. El material se colocó en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL, con 4 esferas de Zirconio, y se sumergió en nitrógeno. Este material fue almacenado posteriormente hasta su uso a -80°C. Al momento de realizar la extracción, el material vegetal se volvió a sumergir en nitrógeno, y se colocó en el disruptor de tejidos durante 45 segundos. Inmediatamente se le agregó 400 µL Buffer AP1, y 4 µL de RNasa A, se mezcló invirtiendo el tubo e incubó a 65°C 10 minutos (invirtiendo los mismos 2 - 3 veces durante ese tiempo). Se agregó 130 µL de Buffer P3 y mezcló por inversión para dejar incubando en hielo 5 minutos. Se centrifugó por 5 minutos a 16.000 x g,

y se transfirió el lisado a una columna QIAshredder. Se centrifugó por 2 minutos y se transfirió el líquido que fluyó por la columna a un tubo nuevo, con cuidado de no remover el pellet. Se agregó 675 µL de Buffer AW1, y se mezcló invirtiendo el tubo. En dos pasos consecutivos se pasó la solución por una columna DNeasy Mini, centrifugando a 9.000 x g por 1 minuto. Se descartó todo el líquido que fluyó por la columna, y la misma se colocó en un tubo colector nuevo. A la columna con la muestra se le agregó 500 µL de Buffer AW2, se centrifugó en las mismas condiciones, y luego se volvió a agregar 500 µL del mismo Buffer, esta vez centrifugando a 16.000 x g por 3 minutos. Finalmente se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga nuevo, y se le agregó 50 µL de Buffer AE para eluir, dejando incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugando a 9.000 x g por 1 minuto. Este paso se repitió con otros 50 µL de Buffer de elución. La calidad del ADN genómico extraído se evaluó corriendo en electroforesis 5 µl de cada muestra.

3.14. Amplificación por PCR del transgen de *Cas9* en líneas transformadas

Para seleccionar líneas de *Arabidopsis* transgénicas con los diferentes vectores binarios con las cuales se las transformó, además de germinar las semillas en medio con selección para las mismas, se realizó PCR del transgén de *Cas9*, el cual se encuentra presente en el vector binario.

Los cebadores utilizados fueron “FwCas9” (5´ - CAACTACCACCCAGCTCACG - 3´) y “RevCas9” (5´ - CCCTTCCCTTATCCCACACG - 3´), generando un amplicón de 300 pb. Las reacciones se montaron según las instrucciones brindadas por el proveedor de la enzima Polimerasa Dream Taq de Thermo Scientific, brindadas por el proveedor de la Polimerasa Dreamtaq (Thermo Scientific, Cat. No. EP0701), en un volumen final de 20 µl: 1X DreamTaq Buffer, Mix de dNTPs a 0,2 mM cada uno, primers a 0,1-1 µM cada uno, molde de ADN 10pg-1µg, Dream Taq (5U/µl) 1,25U, agua. Se realizó un control positivo usando de ADN molde el plásmido pMR285 (sin recombinar) y como control negativo, ADN genómico de *Arabidopsis* sin transformar.

Tabla 3. Programa de PCR para la detección del gen Cas9 en plantas transformadas.

Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	x1
Desnaturalización	95 °C	30 s	x35
Hibridación	54 °C	30 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	10 min	x1

3.15. Búsqueda preliminar de líneas de *Arabidopsis thaliana* editadas mediante PCR de proCV1

Se diseñaron dos PCRs para el genotipado de plantas editadas por HRFA (High Resolution Fragment Analysis) que se requerirá hacer eventualmente. En esta instancia se los usó para una primera búsqueda de ediciones tipo indels (inserciones o deleciones) grandes, visibles en un gel de electroforesis. Para el “PCR proximal” se utilizó los cebadores “5FAM-FwproCV1-902” (5’ - TCCGAATGGAGCCGGTCTTTG - 3’) y “Proximal_Rev” (5’ - GGTGAGAGTTGAGTTGAG - 3’), obteniéndose un amplicón de 911 pb que se encuentra más cercano al inicio de la traducción, y se usará para evaluar ediciones generadas por las construcciones AG, BH, CH y CI. El “PCR distal” utilizó los cebadores “5FAM-Fw proCV1-1195” (5’ - GGTCTCGCTATCCAATTGTAGCTCTT - 3’) y el oligonucleótido reverso del TA para el gRNA H (5’ - ATTGCTTGCCGTGTTTGCAG - 3’), abarcando las posibles ediciones causadas por las construcciones DI, DK, EJ, y JJ, dando un amplicón de 932 pb.

Las reacciones se montaron según las instrucciones brindadas por Bioline, el proveedor de “MyFi™ Mix”. El mix se encuentra a concentración 2X, y contiene MyFi DNAPolymerase, dNTPs, MgCl₂. Se realizaron en un volumen final de 15 µl, con concentración final de 0,2-0,6 µM para ambos cebadores, y alrededor de 200 ng de ADN genómico de las plantas a analizar.

Tabla 4. Programa de ciclado utilizado para la amplificación por PCR a tiempo final de proCV1 usando de molde ADN genómico de plantas transformadas.

Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	x1
Desnaturalización	95 °C	30 s	x35
Hibridación	50 °C ó 57 °C	30 s	
Extensión	72 °C	30 s	

4. Resultados

4.1. Análisis del promotor de *GmCV1*

Con el objetivo de identificar regiones del promotor de *CV1* de soja relevantes para su regulación por estrés, se analizó *in silico* un fragmento de 1500 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción del gen, para identificar posibles CREs usando las bases de datos PlantCARE (Lescot et al., 2002) y PlantPan 4.0 (Chow et al., 2024). Se hizo especial énfasis en aquellos CREs vinculados a la respuesta al estrés hídrico de la planta.

Muchos de los CREs encontrados en el promotor de *CV1* son elementos de unión a factores de transcripción ya identificados como partícipes en la respuesta a estrés abiótico o senescencia. Como se muestra en la Figura 1, se encontraron varios elementos de unión a factores NAC (no apical meristem ATAF1/2 cup-shaped cotyledon 2), WRKY, bHLH (basic helix–loop–helix), AP2/ERF (Apetala 2 / Ethylene Response Factor), C2H2 (Zinc-Finger type C2H2) y ARF (Auxin Response Factor), los cuales son motivos que conectan la señal hormonal (ABA, etileno, auxina, JA) y la percepción de estrés (sequía, salinidad, frío). EIN3 y ERE están estrechamente vinculados al etileno, mientras que STRE y DRE responden a estrés abiótico directo. La presencia de estos elementos es coherente con el patrón de expresión de *CV1* en soja, así como con la actividad del promotor de soja cuando se expresa de forma heteróloga en *Arabidopsis* (Fleitas et al., 2023). A su vez, la identificación de estas regiones permite desarrollar estrategias de edición del promotor buscando alterar la actividad del gen frente al estrés hídrico y otros factores de estrés abiótico.

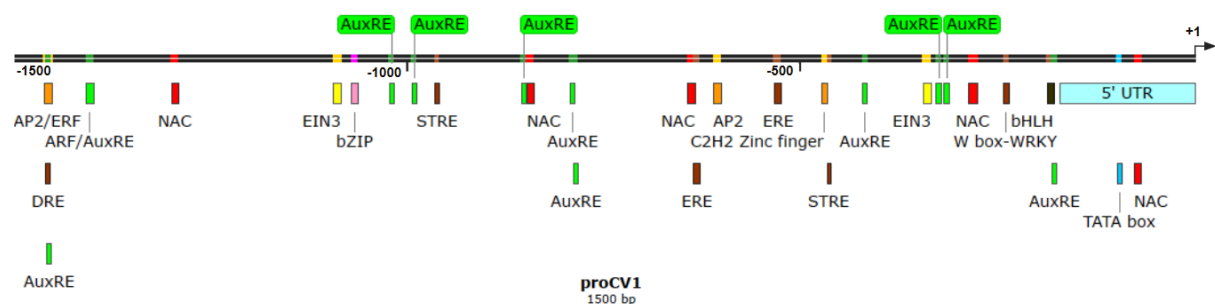


Figura 1. Representación esquemática de CREs típicos de respuesta a estrés abiótico presentes en proCV1. 5'UTR: *untranslated region*. AuxRE: Auxin Response Elements. NAC: NAM (no apical meristem), ATAF1/2, CUC2 (cup-shaped cotyledon2). W-box: WRKY transcription factor binding site. bHLH: basic helix–loop–helix. EIN3: Ethylene Insensitive 3. STRE: Stress-Responsive Element. ERE: Ethylene-Response Element. C2H2: Zinc-Finger type C2H2. AP2: Apetala 2. bZIP: basic Leucine Zipper. DRE: Dehydration-Responsive. ERF: Ethylene Response Factor. ARF: Auxin Response Factor.

4.2. Diseño de gRNAs y generación de construcciones para la edición del promotor de *CV1*

Una vez identificados los posibles CREs presentes en el promotor de *CV1*, potencialmente relevantes para la respuesta a factores de estrés abiótico y senescencia, se diseñó un conjunto de secuencias codificantes de gRNAs distribuidos a lo largo del promotor, y preferentemente cercanos a CREs de interés. El objetivo fue generar gRNAs para la edición de pro*CV1* en estos sitios CREs de interés utilizando el sistema CRISPR-Cas9.

El sistema CRISPR-Cas9, una vez ensamblado y funcionando en el núcleo celular, permite la expresión de Cas9 y gRNAs, que forman ribonucleoproteínas (RNPs), las cuales recorren la cromatina hasta localizar secuencias PAM (*Proto-Adjacent Motif*) 5'-NGG-3'. Una vez hallada esta secuencia por la Cas9, la endonucleasa procede a desenrollar la cromatina para que el gRNA se pueda aparear, y de haber complementariedad, sucede el corte en la doble hebra de ADN.

Para el diseño de gRNAs se utilizaron los programas Chopchop (Labun et al., 2019), Crispor (Concordet & Haeussler, 2018) y CrisprP v2.0 (Lei et al., 2014). Resultó notoria la poca diversidad de sitios sobre los que estaban ubicados los gRNAs ofrecidos por los software utilizados. Tras una mirada más detallada, se observó que el promotor de *CV1* es una zona rica en "A/T", por lo tanto hay pocas secuencias PAM presentes para la Cas9 ("NGG"), factor que limita la posibilidad de diseñar gRNAs de forma más específica sobre varios de los CREs identificados.

Para aumentar la probabilidad de alterar regiones de interés en el promotor de *CV1*, en este trabajo se empleó como estrategia el uso simultáneo de combinaciones de dos gRNAs. Esta técnica busca aumentar la eficiencia en la obtención de deleciones, proponiendo la generación de vectores de expresión del sistema de edición que contengan dos gRNAs. Tal enfoque puede incrementar las posibilidades de lograr deleciones más extensas en el pro*CV1*, con el objetivo ideal de eliminar segmentos de ADN que sean equivalentes a la distancia entre los pares de gRNAs empleados. El uso de una construcción expresando dos gRNAs simultáneamente, ha probado ser exitoso; tanto en regiones codificantes de genes como en promotores para la modificación de CREs (Do et al., 2019; Rodríguez-Leal et al., 2017).

Para generar este repertorio de construcciones génicas que expresen el sistema CRISPR-Cas9 con diferentes combinaciones de dos gRNAs en la planta, se trabajó con la línea de vectores pMR (Fauser et al., 2014; Ma et al., 2015; Ma & Liu, 2016)., que utiliza el

sistema GATEWAY para el clonado de secuencias de gRNAs y su ensamblado en un vector binario.

La tecnología del sistema de clonado Gateway se basa en un sistema de recombinación sitio específica derivado del bacteriófago Lambda (λ), que utiliza sitios de recombinación att (de 25-242 pb) y enzimas clonasa para integrarse o escindirse del genoma bacteriano. El sistema de clonado GATEWAY permite incorporar fragmentos de ADN de forma direccional, y hacer clonados subsecuentes de forma automática a otros vectores de forma eficiente (Hartley, 2000; Katzen, 2007). También permite que numerosos segmentos de ADN puedan ser transferidos simultáneamente a un vector o en paralelo a diferentes vectores (Hartley, 2000; Katzen, 2007). Esto se logra gracias a la acción de la clonasa LR plus, que es integrasa y excisionasa. Esta clonasa cataliza la transferencia de fragmentos de ADN flanqueados por dos sitios attL en el pENTR, hacia un pDES, el cual contiene dos sitios attR (Figura 2). De esta forma, la construcción final contiene dos cassettes de expresión para dos guías diferentes.

En este sistema, la secuencia para el gRNA se clona como adaptador (TA) vía restricción en vectores de entrada (pENTR), entre la secuencia del promotor U6 (AtU6) y la secuencia "scaffold" del gRNA, obteniendo un módulo de expresión para dicho gRNA. Una vez generados los plásmidos conteniendo los módulos de expresión de cada gRNA, los mismos fueron recombinados de forma concatenada de a pares, usando la clonasa LR, en el vector binario de destino (pDEST), para formar un plásmido binario de expresión (pEXP) conteniendo dos cassettes de expresión de gRNAs.

Para la generación de las construcciones se seleccionaron los dos plásmidos pENTR pMR299 (attL1-attR5) y pMR218 (attL5-attL2). En cada uno de estos plásmidos se planificó el clonado de un gRNA específico a modo de adaptador. En total, se dispuso clonar 10 adaptadores (denominados alfabéticamente con las letras A-K), combinados de a pares para generar 8 construcciones de doble gRNA. Se seleccionaron los pares de gRNAs, para clonar uno de ellos en pMR299, y el otro integrante del par en pMR218 (Tabla 5). Los guías clonados en el vector pMR299, se encuentran clonados bajo la regulación del promotor U6 concentrado de *Arabidopsis* (AtU6-conc), mientras que los guías clonados en el vector pMR218 están bajo el control del promotor U6 de *Arabidopsis* (AtU6-29) (Ma et al., 2015). Posteriormente la reacción de recombinación LR planificada, que ocurre entre dos sitios de unión específicos (attL y attR), entre los plásmidos pENTR y el pDEST pMR285 (attR1-attR2), daría como resultado la obtención cada una de las 8 construcciones finales.

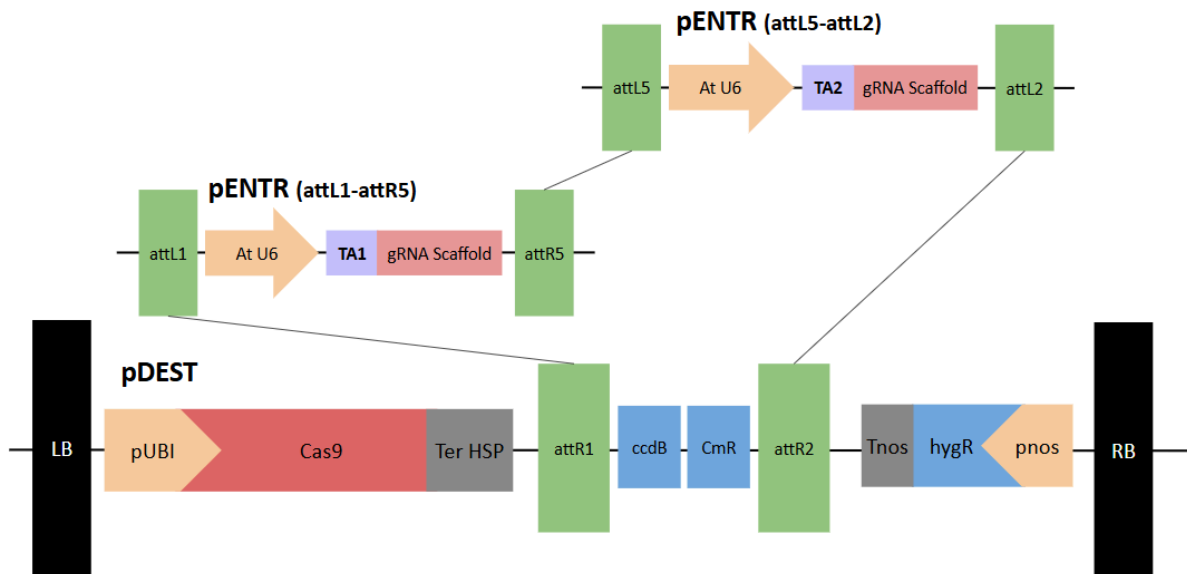


Figura 2. Representación esquemática de recombinação por LR clonasa entre dos pENTR y un pDEST de las construcciones génicas. Se indican los elementos relevantes que están ubicados entre los bordes derecho e izquierdo (RB y LB) del ADN-T (*Transfer-DNA*). Como subproducto de la recombinação, además del pEXP se obtiene un fragmento de ADN en el que quedan el gen letal ccdB y CmB (resistencia a cloranfenicol para la selección en bacteria). attR y attL: sitios de recombinación de los plásmidos de entrada y destino (pENTR y pDEST). pnos: promotor nopalina sintasa. hygR: gen de resistencia en planta a higromicina. Tnos: terminador del gen nopalina sintasa. pUBI: promotor ubiquitina de *Arabidopsis*. Cas9: gen de *Cas9* con codones optimizados para *Arabidopsis*. TerHSP: terminador de proteína de heat shock de *Arabidopsis*. AtU6: promotor reconocible por ARN polimerasa III de *Arabidopsis*. TA: secuencia de gRNA clonada como adaptador. gRNA Scaffold: andamiaje del gRNA.

Los blancos de edición en proCV1, por tanto, se seleccionaron teniendo en cuenta que los gRNAs serían utilizados de a pares. En general, se intentó utilizar pares de gRNAs flanqueando CREs de interés (Figura 3). Las combinaciones de gRNAs a utilizarse en las construcciones finales fueron las siguientes: AG, BH, CH, CI, DI, DK, EJ y JJ.

Tabla 5: Diseño de adaptadores para el clonado de los gRNAs en los plásmidos entrada. A la secuencia de 20 pb seleccionada como gRNA, se le agregan 4 pb (secuencia subrayada) para obtener dúplex con extremos cohesivos. Se indica en qué pENTR se clonará cada adaptador (TA).

Nombre del gRNA	Secuencia fw del TA	Secuencia rev del TA	pENTR
A	<u>ATTG</u> TTAAGGTAAGAGGGTCATCG	<u>AAAC</u> CGATGACCCTCTTACCTTAA	pMR299
B	<u>ATTG</u> TAATTA AAAAGTAAATAATGG	<u>AAAC</u> CCATTATTTACTTTTAATTA	pMR299
C	<u>ATTG</u> AAATTTTCATCCAAGATGCA	<u>AAAC</u> TGCATCTTGGATGAAAATTT	pMR299
D	<u>ATTG</u> TCGTAACGCTAATATCCGAA	<u>AAAC</u> TTCGGATATTAGCGTTACGA	pMR299
E	<u>ATTG</u> CTTGGTCAGTGCGATGGCAA	<u>AAAC</u> TTGCCATCGCACTGACCAAG	pMR299
G	<u>ATTG</u> AAGTCTTGACTTAGAACTAA	<u>AAAC</u> TTAGTTCTAAGTCAAGACTT	pMR218
H	<u>ATTG</u> CTGCAAAACACGGCAAGCAAT	<u>AAAC</u> ATTGCTTGCCGTGTTTGCAG	pMR218
I	<u>ATTG</u> AATCCAGAAGAAGAGTGAAG	<u>AAAC</u> CTTCACTCTTCTTCTGGATT	pMR218
J	<u>ATTG</u> AAATATGCATGATATAAGCT	<u>AAAC</u> AGCTTATATCATGCATATTT	pMR299 pMR218
K	<u>ATTG</u> GTATTTTCAGTGCCTTAATTT	<u>AAAC</u> AAATTAAGGCACTGAAATAC	pMR218

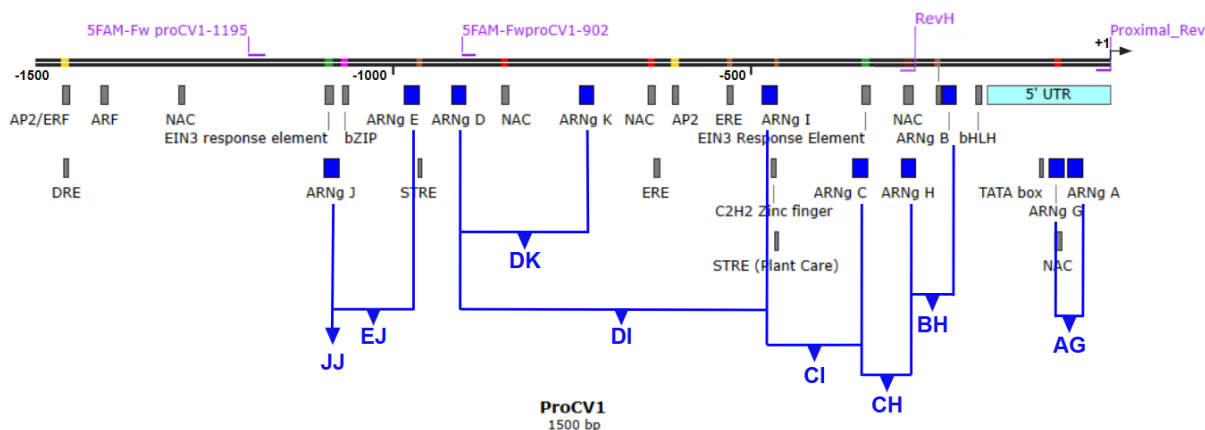


Figura 3. Esquema de proCV1 con ubicación de los gRNAs diseñados para su edición, organizados en pares para su combinación en las construcciones generadas. Se señalan los pares de gRNAs a utilizarse en conjunto, para generar las construcciones: pMR285-AG, pMR285-BH, pMR285-CH, pMR285-CI, pMR285-DI, pMR285-DK, pMR285-EJ y pMR285-JJ.

Las construcciones finales generadas contienen los elementos necesarios adaptados para la expresión del sistema CRISPR-Cas9 en *Arabidopsis*, y para facilitar su incorporación en el genoma usando el método de transformación de plantas mediado por

Agrobacterium tumefaciens. Dicha bacteria utiliza un mecanismo de transformación genética de plantas, mediado por su plásmido Ti (*Tumor inducing*) (Chilton et al., 1977; Păcurar et al., 2011). Durante la infección, una región específica de este plásmido, el ADN-T (*Transfer-DNA*), es transferida e integrada en el genoma nuclear de la célula vegetal. Las secuencias necesarias para su transferencia se encuentran flanqueando el ADN-T y se llaman borde derecho y borde izquierdo (RB y LB). Este ADN-T naturalmente contiene genes para la síntesis de fitohormonas y aminoácidos que solo la bacteria es capaz de utilizar (nopalina, octopina), por lo que se ve alterado el metabolismo de la planta, induciendo la formación de tumores (agallas) (Păcurar et al., 2011).

Este mecanismo fue adaptado para la biotecnología mediante el sistema de vectores binarios. Este sistema separa las funciones: un plásmido Ti "desarmado" (sin ADN-T) proporciona en trans las proteínas de virulencia (vir) necesarias para la transferencia de ADN, mientras que un segundo plásmido, de fácil manipulación, llamado vector binario, contiene el ADN-T modificado. La eliminación de ADN-T del Ti "desarmado" es necesaria para remover los genes de inducción tumoral a modo de no incorporar este tipo de alteraciones en las plantas transgénicas. Entre RB y LB del vector binario, se inserta la construcción génica de interés. De esta forma, al infectar tejidos vegetales, *Agrobacterium* transfiere e integra únicamente esta construcción comprendida entre ambos bordes, que en este caso sería la secuencia necesaria para la expresión del sistema CRISPR-Cas9 en *Arabidopsis*, así como un gen de resistencia para la selección de plantas (Păcurar et al., 2011).

Para cada sitio a editar elegido en el proCV1, se diseñaron los adaptadores de los gRNAs de 20 pb, con extremos protuberantes de 4 pb hacia el 5', complementarios a los extremos cohesivos dejados por la digestión de la enzima de restricción *BbsI* en los pENTR (Tabla 5). Esto se debe a que los plásmidos entrada pMR218 y pMR299, tienen un sitio de corte para *BbsI*, el cual fue usado para el clonado de los gRNAs. Esta enzima reconoce la secuencia 5'-GAAGAC-3' / 3'-CTTCTG-5', pero como es una endonucleasa tipo IIS, el corte lo realiza por fuera de la secuencia de reconocimiento. En la hebra 5'→3' el corte es realizado dos nucleótidos hacia el 3' del sitio de reconocimiento, y en la hebra 3'→5' el mismo sucede a 6 nucleótidos hacia el 5' de la secuencia de reconocimiento. Este tipo de corte genera extremos cohesivos, cuya secuencia puede ser personalizada, y la que en este caso dependerá de los plásmidos entrada utilizados, permitiendo clonar los gRNAs en forma de adaptadores.

Como primer paso para generar las construcciones de la forma anteriormente mencionada, se realizó una preparación de ADN plasmídico a partir de cultivos de las cepas de *E. coli* portadoras de los plásmidos pMR218, pMR299 y pMR285 (conservadas en glicerol a -80°C). Realizada la extracción y comprobada la calidad y cantidad del ADN

obtenido mediante mediciones en espectrofotómetro tipo NanoDrop y corrida electroforética, se procedió con la digestión de los plásmidos con la enzima *BbsI*. Una vez obtenido los plásmidos linealizados, comprobado por electroforesis en geles de agarosa (Figura 4), se procedió a purificar el ADN y cuantificar su concentración.

Como se evidencia en la Figura 4, aquellos carriles con los plásmidos digeridos, muestran una banda de menor migración comparado a las bandas de plásmido sin digerir. Esto se debe a que en su forma lineal, el plásmido presenta mayor resistencia al migrar por el gel, que el plásmido en su forma circularizada y superenrollada. Se puede constatar además en los carriles con el plásmido linealizado, que el tamaño de los mismos es acorde con el tamaño esperado: 2967 pb para pMR218, mientras que el tamaño de pMR299 es ligeramente inferior a la misma banda del marcador, coincidiendo también con su tamaño previsto de 2792 pb.

Cabe mencionar, que la mayor diferencia de tamaños entre los dos pENTR, se debe a que el pMR299 tiene una versión más corta del promotor U6 para la ARN polimerasa III, dándole un tamaño total menor que el pMR218.

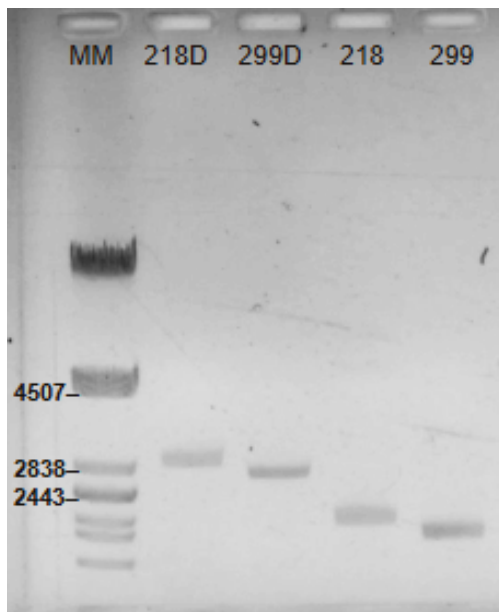


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa 1% para el monitoreo de la digestión enzimática por *BbsI* de los plásmidos pMR218 y pMR299. Los plásmidos pMR218 y pMR299 digeridos (218D y 299D respectivamente) fueron comparados con los plásmidos en su forma circular (carriles 218 y 299). MM: marcador de peso molecular λ -PstI.

Los oligonucleótidos sintetizados para clonar los gRNAs como adaptadores, fueron hibridados y ligados en sus correspondientes vectores entrada y usados para transformar *E. coli* TOP 10 electrocompetentes. Las colonias resistentes al medio selectivo (kanamicina) fueron analizadas para comprobar la presencia del plásmido entrada con su correspondiente adaptador del gRNA. Para ello, se utilizó PCR de colonias, usando el cebador "M13F-40", que se encuentra en la secuencia del pENTR, y el cebador reverso del

oligonucleótido adaptador insertado. El ciclado se mantuvo igual para todos los PCRs pero varía la temperatura de hibridación, dependiendo de la temperatura de melting del cebador reverso. Cabe mencionar, que como los gRNAs seleccionados fueron diseñados sobre una región rica en A/T, algunos de los oligonucleótidos resultantes alcanzan a tener temperaturas de melting bajas, pudiendo dar lugar a inespecificidades en la hibridación. Como control negativo se utilizó como molde el plásmido pMR299 o pMR218 sin adaptador. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 5).

Para cada construcción, se obtuvieron varios clones positivos que mostraron el producto de amplificación con el tamaño adecuado. Para las construcciones pMR299-A, pMR299-B, pMR299-C, pMR299-D, pMR299-E y pMR299-J, el amplicón esperado era de 252 pb. Para las construcciones pMR218-G, pMR218-H, pMR218-I, pMR218-J y pMR218-K, el amplicón esperado era de 475 pb. En la Figura 6 se representa un diagrama de la conformación de estos vectores.

Considerando lo anterior, se puede concluir que los tamaños obtenidos de los amplicones coinciden con los esperados, notándose la diferencia de tamaños entre amplicones a partir de distintos plásmidos entrada. Los amplicones de las construcciones con pMR299, son menores que aquellos amplicones a partir del pMR218, consistente con la diferencia de tamaño entre ellos, ya registrada en la Figura 4, ya que con los cebadores elegidos para el PCR de colonias, se comprende en el amplicón al promotor U6 de la polimerasa III. Los resultados obtenidos indican que las construcciones generadas a partir de los vectores pENTR presentan la composición esquematizada en la Figura 6.

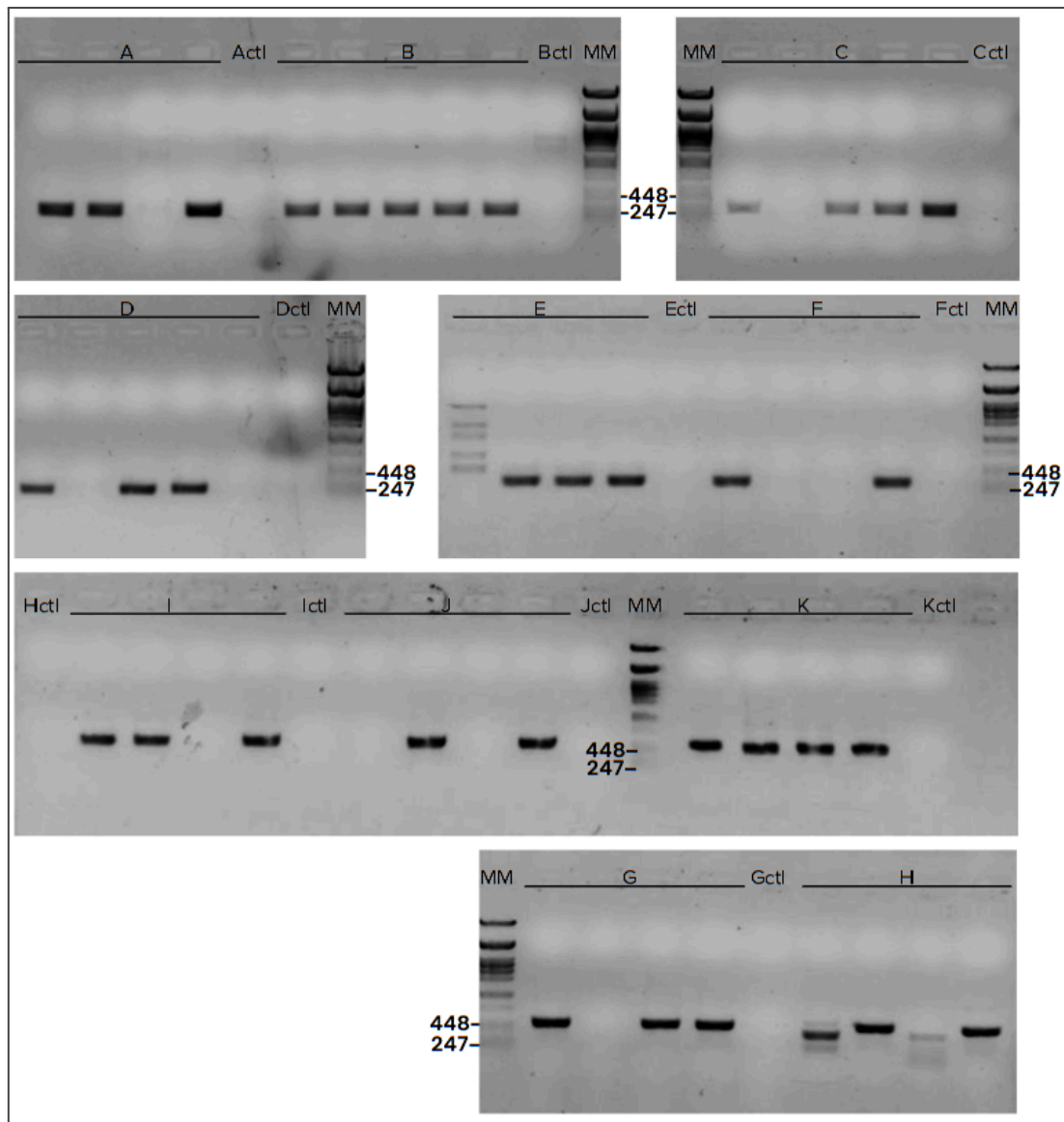


Figura 5: Electroforesis en geles de agarosa 1 % de PCR de colonias para identificar clones que incorporaron el adaptador correspondiente a cada gRNA. Se observa amplificación de al menos dos colonias para todas las construcciones: siendo pMR299-A, pMR299-B, pMR299-C, pMR299-D, pMR299-E, pMR299-J; A, B, C, D, E y J respectivamente; y pMR218-G, pMR218-H, pMR218-I, pMR218-J, pMR218-K; G, H, I, J y K respectivamente. MM: marcador de peso molecular (λ -PstI).

Se eligieron clones positivos por construcción, los cuales fueron analizados por restricción con *Bbs*I para confirmar la presencia del inserto. En ese caso, la incorporación del adaptador altera y elimina el sitio de restricción. (Figura 7). Como control se utilizó plásmido sin adaptador. La electroforesis en geles de agarosa de los productos de digestión con *Bbs*I permitió comprobar la incorporación de los adaptadores en todos los casos, dado que se pudo ver la pérdida del sitio de restricción en los clones analizados, mientras que los plásmidos vacíos fueron linealizados.

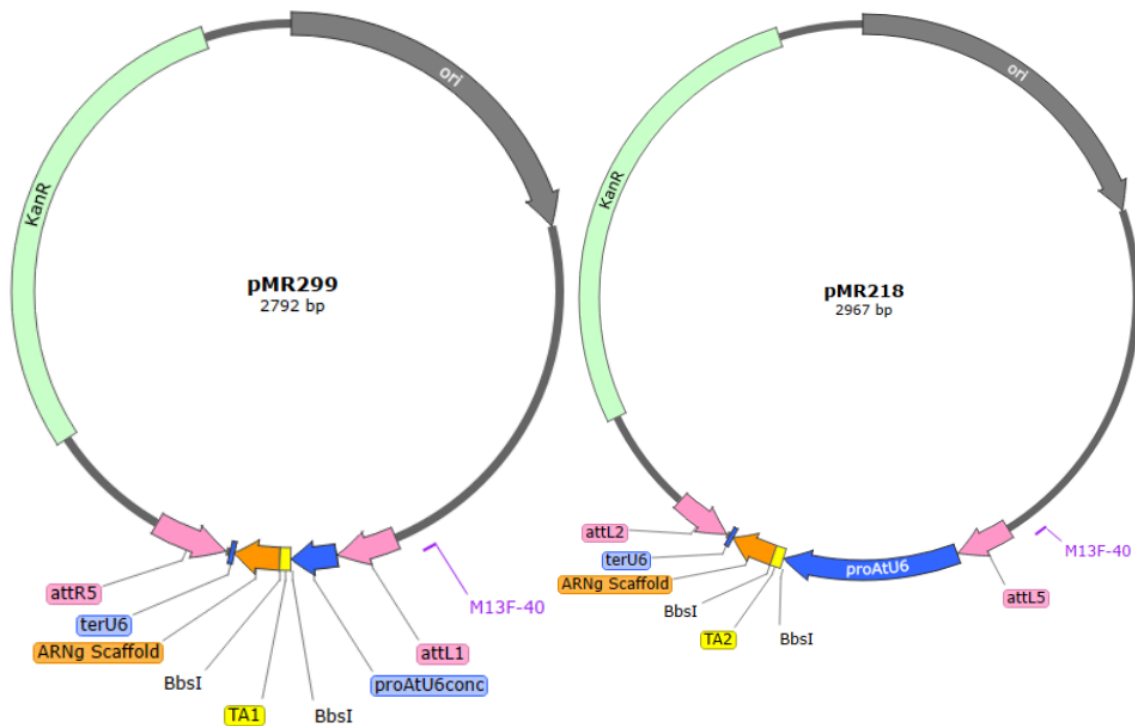


Figura 6: Diagrama de los vectores entrada pMR299 y pMR218 para la generación de construcciones génicas para la edición de proCV1 con dos gRNAs simultáneamente. attB1, attB5, attB2: sitios en los que sucedió recombinación LR. proAtU6, proAtU6conc: promotores U6 y U6 concentrado de la ARN polimerasa III de *Arabidopsis*. TA: adaptador de gRNA. gRNA Scaffold: región conservada de los gRNAs. TerU6: terminador para la ARN polimerasa III (poli T). Se señalan también los sitios de corte de *BbsI* y el cebador M13F-40.

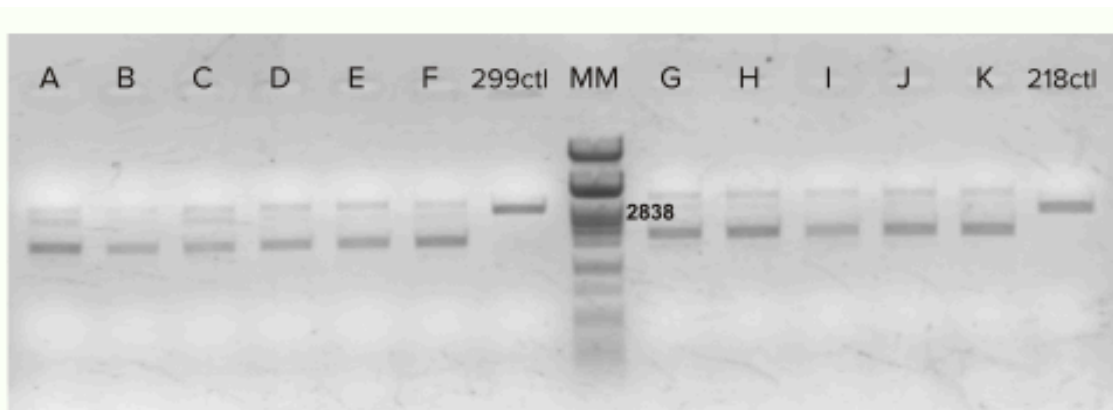


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de digestión con *BbsI* de plásmidos entrada para verificar incorporación de los adaptadores. Cada constructo identificado con el nombre del gRNA a incorporar en el correspondiente plásmido. 299ctl y 218ctl corresponden a plásmido sin adaptador a modo de control positivo de digestión. MM: marcador de peso molecular (λ -PstI).

Se seleccionó un clon positivo para cada construcción, y se procedió a recombinar combinaciones de dos módulos de expresión de gRNAs en el vector binario de destino pMR285 vía Gateway, usando la clonasa LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix. Para ello, se realizaron 8 reacciones diferentes entre pMR285, pMR218-TA y pMR299-TA, siendo TA un adaptador (*Target Adaptor*) específico. Los productos de las reacciones de recombinación fueron introducidos en *E.coli* TOP 10 mediante electroporación y plaqueados en medio selectivo (espectinomicina) para seleccionar las bacterias transformadas.

La verificación de la presencia del plásmido de expresión completo, es decir pMR285-XY (siendo X e Y una combinación única de dos gRNAs), conteniendo los dos cassettes de expresión de gRNAs, se realizó mediante PCR de colonias usando dos combinaciones diferentes de cebadores. Por un lado, se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos sintetizados para generar el adaptador para expresión de los gRNAs. En este caso, se utilizó el cebador de orientación “sentido”, correspondiente al adaptador clonado en el vector pMR299 (attL1-attR5) y un cebador en orientación “antisentido”, del adaptador clonado en el vector pMR218 (attL5-attL2). Por otro lado, también un cebador que hibrida en una región del plásmido pMR285 (HSPterFw), en conjunto con un cebador antisentido de uno de los adaptadores. En la Figura 8 se muestra un esquema de la configuración de las construcciones finales luego de la recombinación del pMR285 con ambos pENTRs, y se señalan los lugares de hibridación de los cebadores.

Para las construcciones pMR285-AG, pMR285-BH, pMR285-CH, pMR285-CI, pMR285-DI, pMR285-DK y pMR285-EJ, se utilizaron de cebadores los dos oligonucleótidos de los adaptadores para los gRNAs (Tabla Anexo), siendo el producto de amplificación esperado de 541 pb. En la Figura 9, se evidencia un amplicón de tamaño aproximado al esperado para las construcciones indicadas, en la mayoría de las colonias evaluadas. Los controles se realizaron usando de ADN molde el pMR285 sin recombinar, y todos resultaron correctos sin amplificaciones inespecíficas. Las bandas visualizadas en el carril control de la construcción pMR285-EJ, se deben a un error de manipulación en la siembra del gel, en el que se contaminó dicho carril con marcador de peso molecular.

Por otro lado, para la construcción pMR285-JJ fue generada por error, conteniendo dos módulos de expresión del gRNA “J”. Para analizar los clones de esta construcción, se utilizó el cebador HSPterFw y el oligonucleótido J reverso, por lo que en caso de haber sucedido una correcta recombinación de los plásmidos, se espera obtener dos amplicones, dada la presencia de los dos sitios de hibridación del cebador J. Uno de estos amplicones deberá ser de un tamaño aproximado de 900 pb y el otro de alrededor de 400 pb. En la Figura 9 para esta construcción, podemos corroborar que se obtuvo los amplicones esperados, indicando que los cassettes de expresión de ambos gRNAs fueron incorporados en el pMR285.

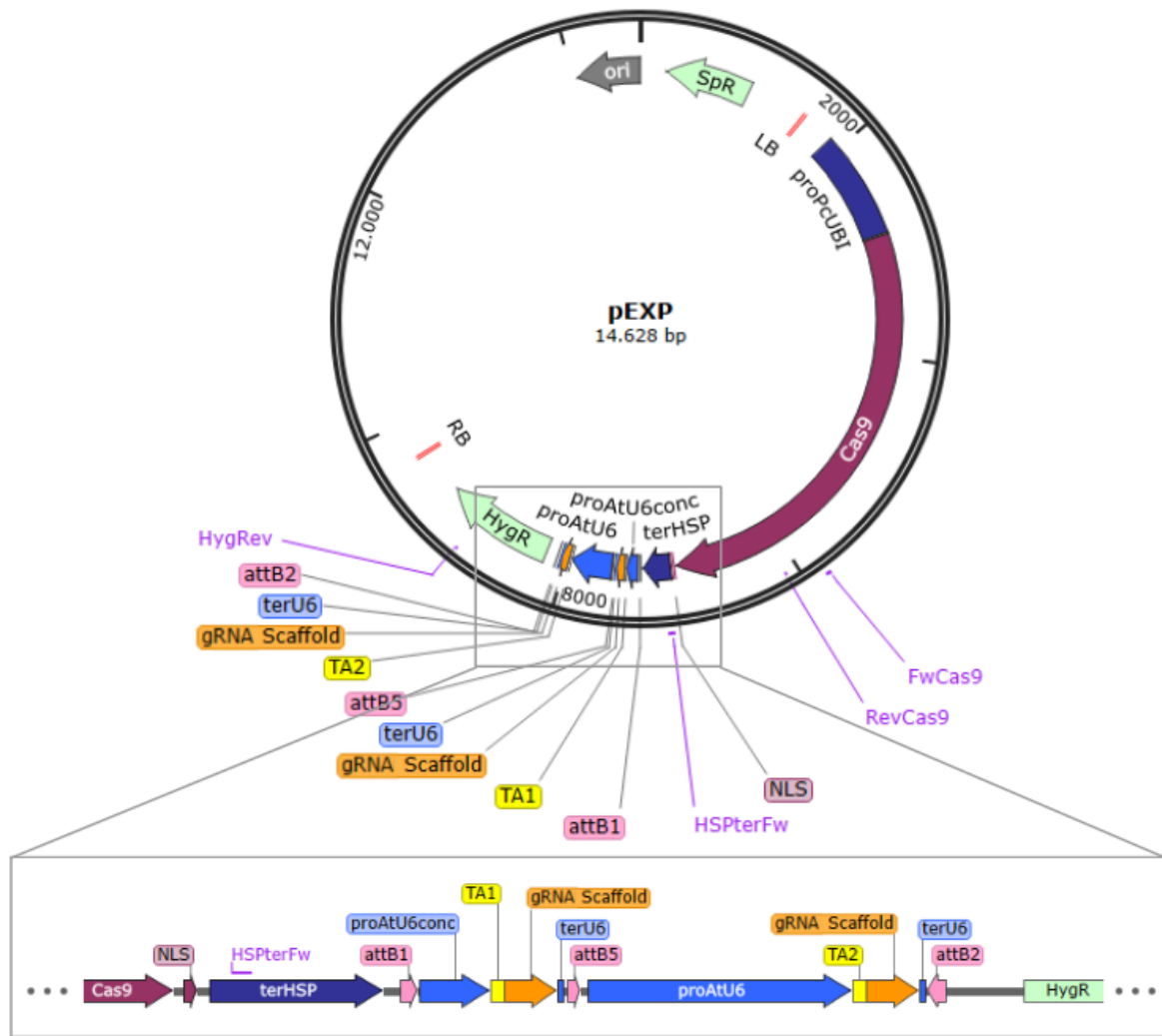


Figura 8. Diagrama del vector de expresión o vector binario, para la edición de proCV1 con dos gRNAs simultáneamente. RB, LB: borde derecho y borde izquierdo del ADN-T. SpR: resistencia a espectinomicina en bacteria. HygR: resistencia a higromicina en plantas. proPcUBI: promotor del gen de ubiquitina de perejil. Cas9: gen de *SpCas9* con codones optimizados para su expresión en *Arabidopsis* y señal de localización nuclear. TerHSP: terminador de gen para proteína de choque térmico (Heat Shock Protein) de *Arabidopsis*. attB1, attB5, attB2: sitios en los que sucedió recombinación LR. proAtU6, proAtU6conc: promotores U6 y U6 concentrado de la ARN polimerasa III de *Arabidopsis*. TA: adaptador de gRNA. gRNA Scaffold: región conservada de los gRNAs. TerU6: terminador para la ARN polimerasa III (poli T).

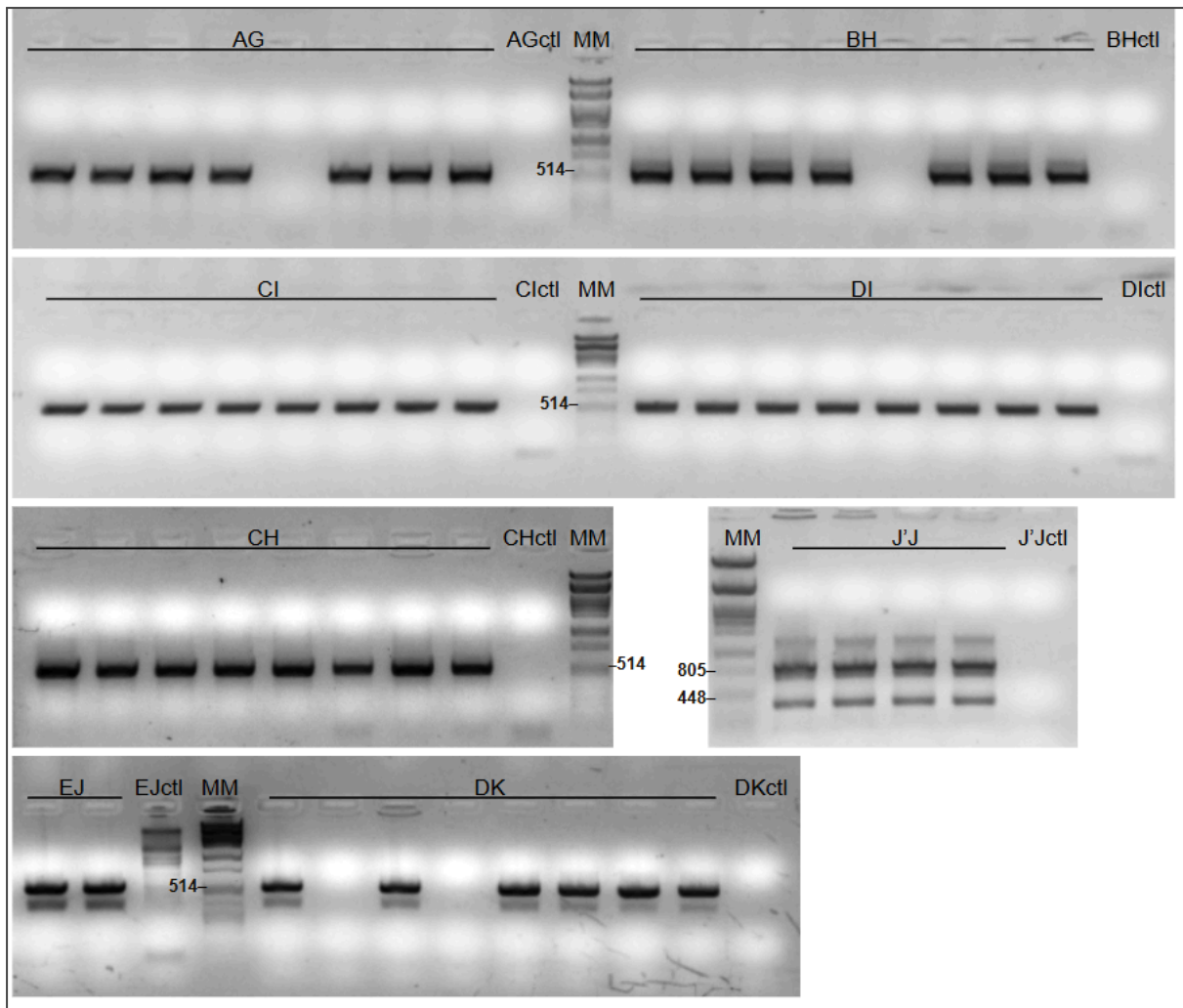


Figura 9. Electroforesis en geles de agarosa 1 % de resultados de PCR de colonias, para confirmar presencia de vector de expresión final generado. El PCR de colonias se realizó con las siguientes combinaciones de cebadores para las respectivas construcciones: pMR285-AG (AG), FwA + RevG; pMR285-BH (BH), FwB + RevH; pMR285-CH (CH), FwC + RevH; pMR285-CI (CI), FwC + RevI; pMR285-DI (DI), FwD + RevI; pMR285-DK (DK), FwD + RevK; pMR285-EJ (EJ), FwE + FwJ; pMR285-JJ (JJ), HSPterFw + RevJ. Los amplicones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1% con bromuro de etidio (BrEt). Como control negativo (ctl) se utilizó ADN de pMR285 sin recombinar. MM: marcador de peso molecular (λ -PstI).

Pese a que para algunas construcciones se detectó la presencia de amplicones de tamaños no esperados, resultado de posible hibridación inespecífica, esto no impidió que se evidenciara la banda prevista para el vector de expresión generado. Por este motivo se prosigió con la secuenciación de las construcciones finales.

De las colonias para las cuales se comprobó la presencia del vector expresión en la Figura 9, se eligieron al menos dos para realizar extracción de ADN plasmídico. Una vez cuantificado se enviaron estas muestras a secuenciar. En la Figura 10 se aprecia una sección de los resultados de secuenciación obtenidos, mostrándose la presencia de las dos secuencias de gRNAs introducidas en el plásmido correctamente.

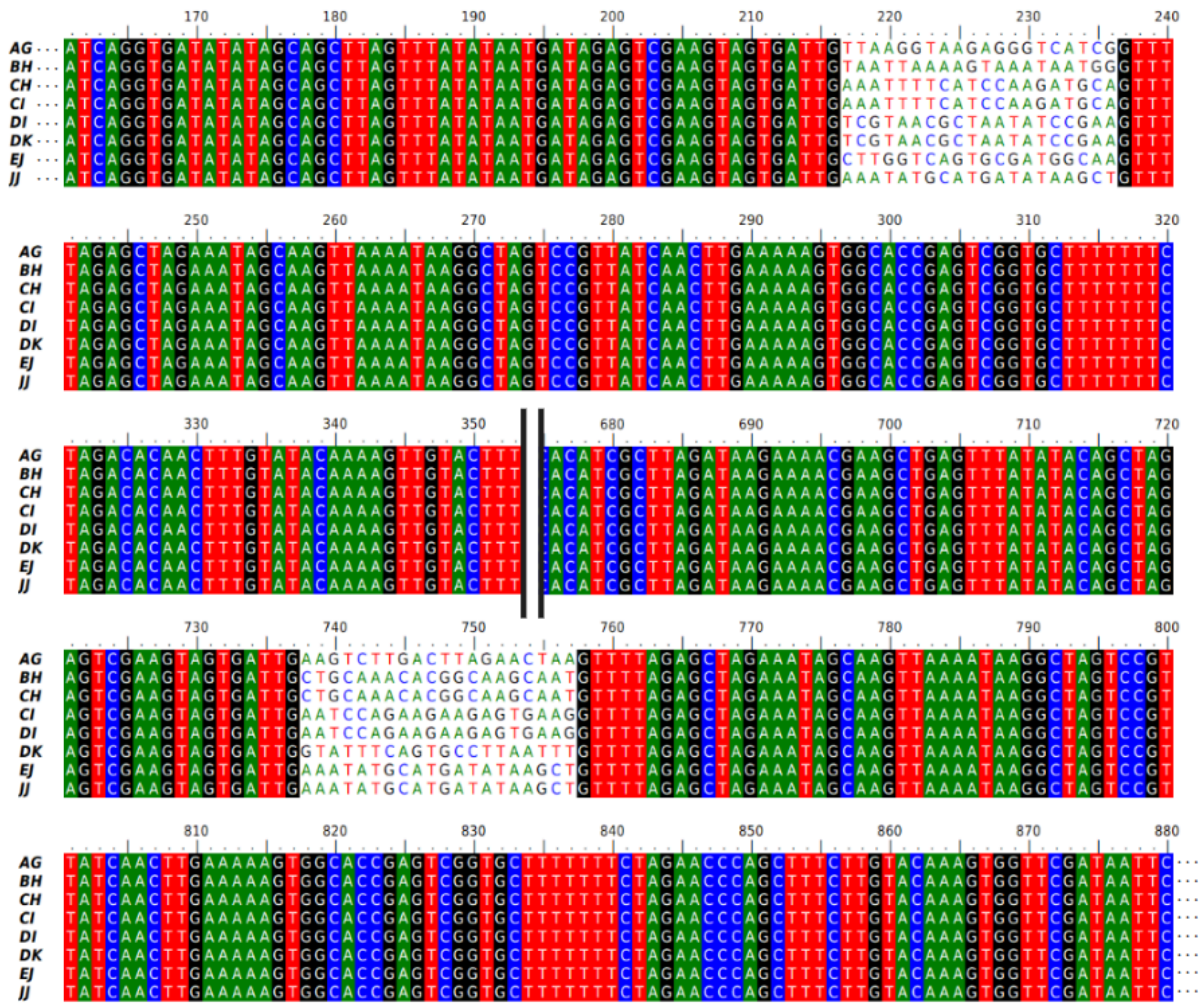


Figura 10. Alineamiento de secuencias de ADN correspondientes a la región que contiene los adaptadores de los gRNAs en las distintas construcciones finales destinadas a la edición de proCV1. A la izquierda el nombre de los vectores finales fue otorgado por su composición y orden de los gRNAs que presentan.

Las construcciones finales (pMR285-AG, pMR285-BH, pMR285-CH, pMR285-CI, pMR285-DI, pMR285-DK, pMR285-EJ, pMR285-JJ), fueron introducidas en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 mediante electroporación. A su vez, se introdujo el vector pMR285 vacío, careciendo de cassettes de expresión de gRNAs. Esta última cepa se la denominó “VACÍO”, y se utilizó posteriormente como control en la transformación de *Arabidopsis*. De esta forma es posible descartar posibles efectos no específicos resultantes de la expresión de Cas9 y del proceso de transformación.

Para corroborar la presencia de los vectores finales a utilizarse en la edición de proCV1, en las cepas de *Agrobacterium*, se realizó PCR de colonias utilizando los cebadores descritos anteriormente para el análisis de la obtención de construcciones finales en *E. coli* (Figura 9). Los resultados evaluados por electroforesis evidenciaron la obtención de amplicones de los tamaños esperados. Para corroborar la incorporación del plásmido

pMR285 “vacío” a *Agrobacterium*, el PCR fue realizado usando dos cebadores que hibridan en en el plásmido, el HSPterFw y el HygRev. Como se observa en la Figura 11, se logran obtener al menos dos cepas de *Agrobacterium* transformadas exitosamente con pMR285, ya que se ve una banda de alrededor de 1800 pb como era lo esperado, coincidiendo con la banda del mismo tamaño en el control, en donde se usó como ADN molde el plásmido purificado.

Como último paso luego de la obtención de las ocho cepas de *Agrobacterium* obtenidas con los vectores para la edición de proCV1 y una cepa como *mock* con el vector sin gRNAs, se las guardó en glicerol a -80°C.

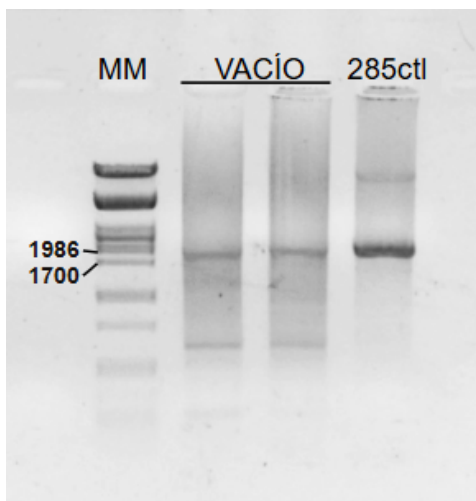


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1% de PCR de colonias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con plásmido pMR285 vacío. Como control positivo se realizó un PCR a partir del el plásmido pMR285 purificado (285ctl). En todos los casos se utilizó la combinación de cebadores HSPterFw + el HygRev. MM: marcador de peso molecular (λ -PstI).

Como parte de los resultados obtenidos en esta sección, se confirmó la clonación exitosa de los gRNAs en forma de adaptadores en sus respectivos pENTR, obteniendo las construcciones: pMR299-A, pMR299-B, pMR299-C, pMR299-D, pMR299-E, pMR218-G, pMR218-H, pMR218-I, pMR218- J, pMR218-K. Dichas construcciones se recombinaron de a pares y con el pDEST, obteniéndose las construcciones finales que expresan simultáneamente dos gRNAs: pMR285-AG, pMR285-BH, pMR285-CH, pMR285-CI, pMR285-DI, pMR285-DK, pMR285-EJ, pMR285-JJ. Las mismas fueron usadas para transformar *Agrobacterium*, generándose 9 cepas, 8 expresantes del sistema de edición de proCV1, y una cepa conteniendo el pMR285 sin gRNAs a modo de control.

4.3. Transformación de *Arabidopsis* proCV1:GUS.

Con el objetivo de evaluar la relevancia de distintas regiones del promotor CV1 en la regulación del gen en respuesta a condiciones de estrés abiótico, se utilizó como modelo, una línea transgénica de *Arabidopsis* conteniendo el gen reportero *GUS* bajo la regulación del promotor de CV1 de soja (proCV1:GUS) (Fleitas et al., 2023). Las 8 construcciones génicas para edición de distintas regiones del promotor (pMR285-AG; pMR285-BH; pMR285-CH; pMR285-CI; pMR285-DI; pMR285-DK; pMR285-EJ; pMR285-JJ) y el vector vacío (pMR285), fueron transformadas en *Arabidopsis* proCV1:GUS mediante infiltración de flores según Clough y Bent (1998). Para ello, las plantas fueron germinadas en presencia de fosfitotricina como agente selectivo para la construcción proCV1:GUS, y luego trasplantadas a macetas, donde se las dejó crecer hasta obtener un número importante de botones florales (Figura 12A). A estas plantas se les realizó poda de despunte, para inducir la activación sincrónica de los meristemas axilares y obtener una mayor proliferación de tallos florales. De esta manera se obtuvo mayor densidad de inflorescencias, de forma uniforme en todas las plantas a transformar. Las células transformadas son generalmente de tejidos progenitores del gametofito, los gametofitos maduros o incluso los embriones recién fertilizados (Clough & Bent, 1998).

Se transformaron 20 plantas por construcción génica, por lo que la transformación con todos los vectores no fue simultánea. Dicho procedimiento se realizó según el protocolo de Clough & Bent (1998), pero a diferencia de este, las flores no fueron sumergidas en la solución de infiltración, sino que ésta fue depositada de a gotas con una pipeta automática sobre cada botón floral (Figura 12B). Posteriormente se colocó una cubierta plástica transparente por maceta, para conservar la humedad evitando la pronta evaporación de la solución de infiltración (Figura 12C), la cual fue retirada al día siguiente de la inoculación. El procedimiento de transformación fue repetido cuatro veces sobre las mismas plantas, con la misma construcción génica, cada día de por medio, aprovechando el hecho de que las plantas siguieron generando botones florales.

Una vez culminado el proceso de transformación, las plantas se dejaron crecer hasta el momento de la cosecha de semillas de la generación T0 (Figura 12D).

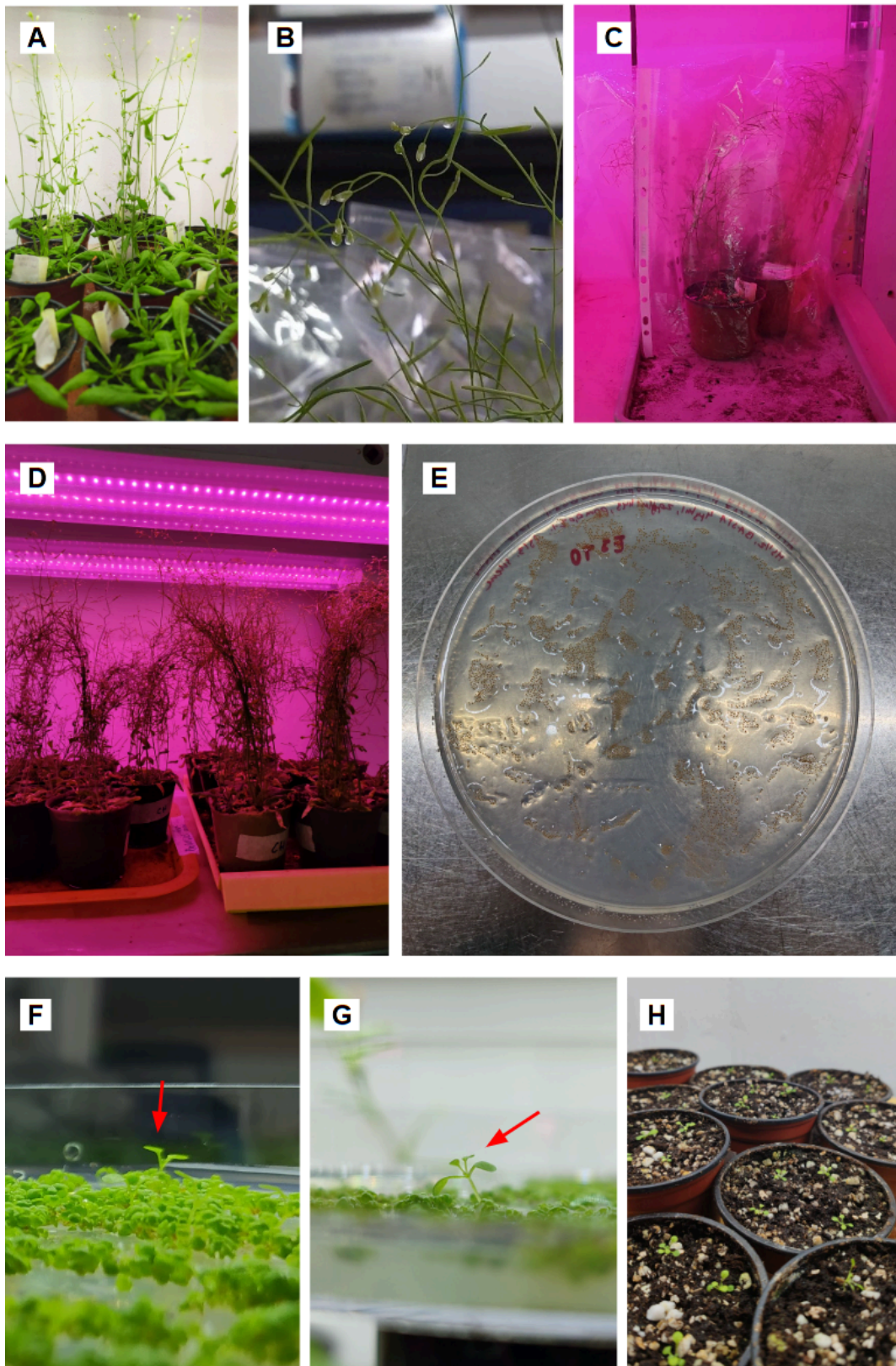


Figura 12. Transformación de *Arabidopsis* proCV1:GUS y selección de semillas T0. **(A)** Plantas de *Arabidopsis* a ser transformadas. **(B)** Variante del procedimiento de transformación por inmersión floral, en el que la solución de infiltración es colocada de a gotas sobre los botones florales. **(C)** Plantas transformadas cubiertas para evitar la evaporación de la solución de infiltración. **(D)** Finalización del proceso de transformación, se deja crecer las plantas hasta que formen las vainas

con semillas. **(E)** Semillas T0 plaqueadas en medio MS ½ con selección por fosfinotricina e higromicina. **(F)** y **(G)** Crecimiento diferencial de plantas resistentes a fosfinotricina e higromicina, notándose por la gran expansión de los cotiledones respecto a las no resistentes. **(H)** Trasplante de *Arabidopsis* T0 resistente para posterior genotipado y producción de semillas.

Las semillas T0 de las 20 plantas transformadas con la misma construcción fueron cosechadas de manera conjunta. Para cada construcción se logró cosechar al menos alrededor de 1 gramo de semillas T0. Estas semillas, fueron posteriormente esterilizadas superficialmente y plaqueadas en medio con selección: higromicina (para asegurar la presencia de la construcción de edición del promotor) y fosfinotricina (para seleccionar la construcción proCV1:GUS) (Figura 12E).

Los resultados muestran que en todos los casos se obtuvieron plantas resistentes a higromicina, evidenciado por un patrón de crecimiento diferencial mayor al de las plantas sensibles a este agente de selección (Figuras 12F, 12G). Aquellas plantas que lograron crecer al punto de desarrollar y expandir sus cotiledones en medio con selección, fueron trasplantadas a macetas con turba y cultivadas hasta generar semillas de la generación T1 (Figura 12H). La eficiencia de transformación se situó entre el 0,5 y 3 %.

El procedimiento de selección de líneas T0 con las diferentes construcciones se realizó de manera reiterada, obteniendo de cada repetición, un lote de plantas T0 que fueron trasplantadas a maceta. Los resultados a continuación, corresponden al primero de los lotes de plantas T0 seleccionadas.

Las plantas del primer lote fueron genotipadas para comprobar la presencia de la construcción génica con la cual se las transformó. Para ello, se extrajo ADN genómico y se analizó la presencia del gen de la Cas9 mediante PCR, usando los cebadores “FwCas9” y “RevCas9”. El producto de amplificación de esta reacción tiene un tamaño esperado de 300 pb. Como control negativo de este PCR, se usó un *pool* de ADN genómico plantas de *Arabidopsis* proCV1:GUS sin transformar, y como control positivo se utiliza el plásmido pMR285 de ADN molde.

Las reacciones de PCR fueron realizadas a partir de ADN genómico extraído de hojas de plantas cultivadas durante 10 días en macetas. Dada la cantidad de construcciones génicas utilizadas y de líneas posiblemente transgénicas seleccionadas, las reacciones de PCR fueron realizadas a partir de “*pools*” de muestras de tejido vegetal de entre 2 y 4 plantas transformadas con la misma construcción génica.

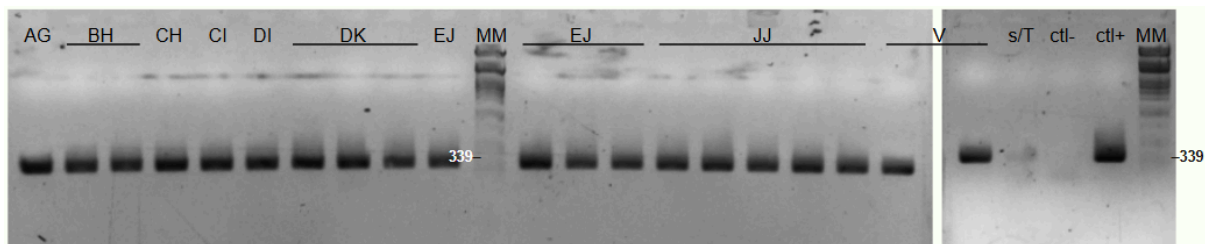


Figura 13. Genotipado de plantas de *Arabidopsis* transformadas para detección del gen Cas9 presente en las construcciones para edición génica. PCR realizado usando cebadores presentes en el gen de Cas9: FwCas9 + RevCas9. Electroforesis en geles de agarosa 1 % de productos de amplificación generados a partir de *pools* de plantas transformadas con las construcciones para edición de proCV1. AG, BH, CH, CI, DI, DK, EJ, JJ: *pools* de plantas con las construcciones pMR285-AG, pMR285-BH, pMR285-CH, pMR285-CI, pMR285-DI, pMR285-DK, pMR285-EJ, pMR285-JJ respectivamente. V: *pool* de plantas transformadas con el vector vacío (pMR 285 sin cassettes de expresión de gRNAs). s/T: *pool* de *Arabidopsis* proCV1:GUS sin transformar. ctl-: reacción sin ADN molde. ctl+: pMR285 como ADN molde. MM: marcador de peso molecular (λ -PstI).

Los resultados demuestran la transformación exitosa de plantas de *Arabidopsis* proCV1:GUS con las construcciones generadas (Figura 13). Para todos los *pools* analizados, se visualiza una banda del tamaño esperado (300 pb). El control negativo correspondiente a una reacción de PCR en ausencia de ADN genómico, así como en presencia de ADN genómico de *Arabidopsis* proCV1:GUS sin transformar con las construcciones realizadas, exhibieron la ausencia de producto de amplificación. Por su parte, el control positivo de la reacción, en presencia de ADN del plásmido pMR285, generó un producto de amplificación del tamaño esperado.

Estos resultados confirman la obtención de líneas transgénicas de *Arabidopsis* para las 9 construcciones con las cuales se las transformó. Si bien los resultados refieren a muestras compuestas con ADN genómico de varias plantas T0, con certeza podemos definir que al menos una planta por *pool* presenta la construcción para la edición de proCV1.

4.4. Análisis preliminar de la eficacia de edición del promotor de CV1

A modo exploratorio, se realizó un análisis preliminar de la actividad de los gRNAs diseñados y del sistema de edición génica empleado, mediante genotipado de dos regiones de proCV1 en las líneas de *Arabidopsis* transgénicas. Para ello, se analizaron los mismos *pools* de ADN genómico de plantas transformadas, que fueron usados para identificar líneas transgénicas. El análisis preliminar se basó en identificar posibles modificaciones en el

tamaño de amplicones obtenidos a partir de la amplificación de dos regiones del promotor proCV1 en plantas transformadas y no transformadas.

De esta manera, en caso de haber deleciones o inserciones (indels) de un tamaño significativo, las mismas podrían evidenciarse mediante electroforesis en gel de agarosa. El diseño de los cebadores se realizó teniendo en cuenta que en el futuro se prevé emplear una técnica sensible para detectar indels pequeños, que es el análisis de fragmentos de alta resolución (HRFA por sus siglas en inglés). Esta técnica permite distinguir diferencias de tamaño de fragmentos de ADN de hasta 1 pb a través de la separación de los mismos en electroforesis capilar y su detección mediante el marcado de uno de los cebadores con un fluoróforo.

En ese contexto, los cebadores “sentido” (Fw), fueron marcados en su extremo 5’ con el fluoróforo FAM (5-carboxifluoresceína). Dado el tamaño de la región del promotor conteniendo secuencias blanco de los gRNAs diseñados (al menos 1000 pb), se diseñaron cebadores para generar dos amplicones: el llamado “PCR proximal”, con los cebadores “5FAM-FwproCV1-902” y “Proximal_Rev”; y el “PCR distal”, con los cebadores “5FAM-Fw proCV1-1195” y “Proximal_Rev”; y el oligonucleótido reverso del TA para gRNA H (“RevH”). En el primer caso, se espera un amplicón de 911 pb que se encuentra más cercano al inicio de la traducción, y se usará para evaluar ediciones generadas por las construcciones pMR285-AG, pMR285-BH, pMR285-CH y pMR285-CI. Por otro lado, se espera que el PCR distal de lugar a amplicón de 932 pb y abarque las posibles ediciones causadas por las construcciones pMR285-DI, pMR285-DK, pMR285-EJ, y pMR285-JJ (Figura 14).

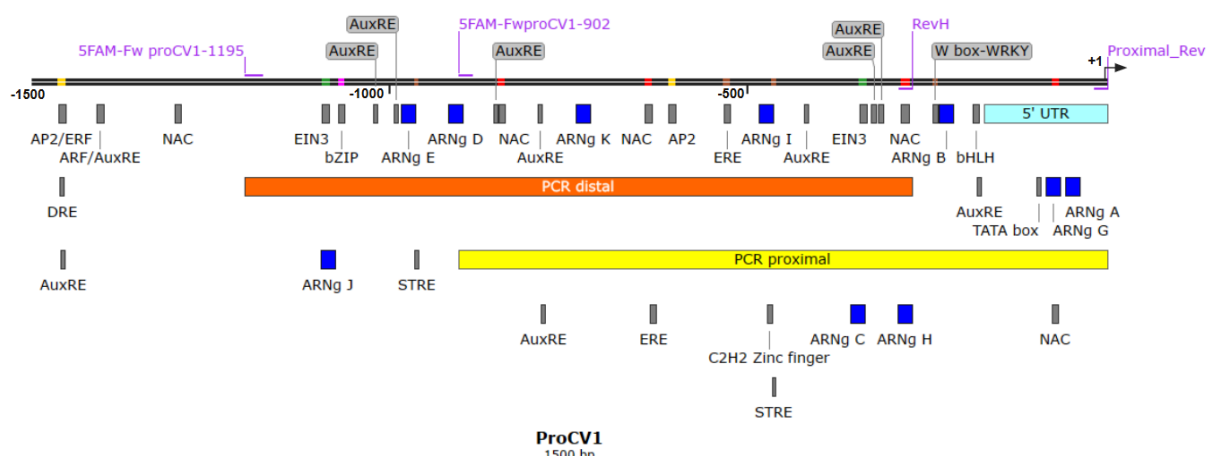


Figura 14. Representación esquemática de proCV1 y de los amplicones resultantes del PCR distal y proximal. Se señala la posición de los CREs identificados como relevantes con sus respectivos nombres y los gRNAs utilizados en las distintas construcciones génicas. Se señalan los cebadores utilizados para el PCR distal: 5FAM-FwproCV1-1195 y RevH, con su respectivo amplicón en color anaranjado. Los cebadores para el PCR proximal están señalados como: 5FAM-FwproCV1-902 y Proximal_Rev, con su respectivo amplicón esperado en color amarillo.

Resulta relevante resaltar que, si bien se generaron las herramientas para genotipar el locus de interés mediante HRFA, en este caso en particular, las muestras fueron analizadas preliminarmente mediante electroforesis convencional en geles de agarosa. Con esta técnica, la diferencia de tamaño resoluble de fragmentos de alrededor de ~1000 pb suele ser de entre el 5 % y el 10 %. Esto equivale aproximadamente a 50-100 pb.

Tomando en cuenta estas consideraciones, se realizaron las reacciones de PCR y se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Los resultados evidenciados en la Figura 15A y 15B, muestran que, al menos para las líneas transformadas con las construcciones pMR285-DI y pMR285-DK, se observa la presencia de amplicones de menor tamaño que el esperado para la secuencia no editada. Al tratarse de un *pool* de muestras, no es posible determinar si se tratan de deleciones homocitogotas o heterocitogotas.

Para las otras líneas analizadas no fue posible determinar con esta técnica, la presencia o ausencia de deleciones de menor tamaño.

Para la muestra DI, la banda de menor tamaño ronda los 500 pb. Si el amplicón distal de proCV1 sin editar tiene un tamaño de 932 pb, la presencia del segundo amplicón de menor tamaño estaría indicando una deleción de aproximadamente 432 pb. Si consideramos que el sitio de corte del sistema CRISPR-Cas9, sucede a 3 nt hacia el 5' de la secuencia PAM para los ambos gRNAs expresados en esta construcción (D e I), podemos calcular la distancia entre los cortes. Esta distancia calculada entre los sitios de corte predichos para los gRNAs D e I es de 434 pb. La notable concordancia entre esta distancia teórica y el tamaño de la deleción observada experimentalmente sugiere que el evento de edición pudo haber ocurrido en los sitios diana diseñados. Por lo tanto, el amplicón de ~500 pb corresponde al alelo editado, donde la región genómica comprendida entre los dos cortes mediados por Cas9 pudo haber sido eliminada durante la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Este resultado tiene potencial para validar la funcionalidad de ambos gRNAs en la construcción DI, y el mecanismo esperado de generación de deleciones largas mediante el uso de un par de gRNAs.

Por otro lado, en el resultado de la muestra del tercer pool DK, la banda correspondiente al proCV1 editado, es de un tamaño aproximado de 600 pb, habiendo sido necesaria entonces, una deleción de alrededor de 332 pb. La distancia entre este par de gRNAs en el proCV1, es de 178 pb. Aunque en esta situación descrita la deleción no coincide con la distancia entre D y K, esto no invalida el éxito de la edición, y resalta una característica inherente a la tecnología: la generación de alelos con tamaños de deleción variables e impredecibles, los cuales pueden ofrecer un rango más amplio de efectos fenotípicos para su estudio.

Estos resultados permiten confirmar la edición de proCV1, con al menos dos de las construcciones generadas: DI y DK. La trazabilidad de cada pool analizado, permite continuar la identificación y caracterización de dichas ediciones. Respecto a las muestras para las cuales no se identificó ediciones detectables en el gel de electroforesis, se planifica continuar con la etapa siguiente de genotipado: HRFA.

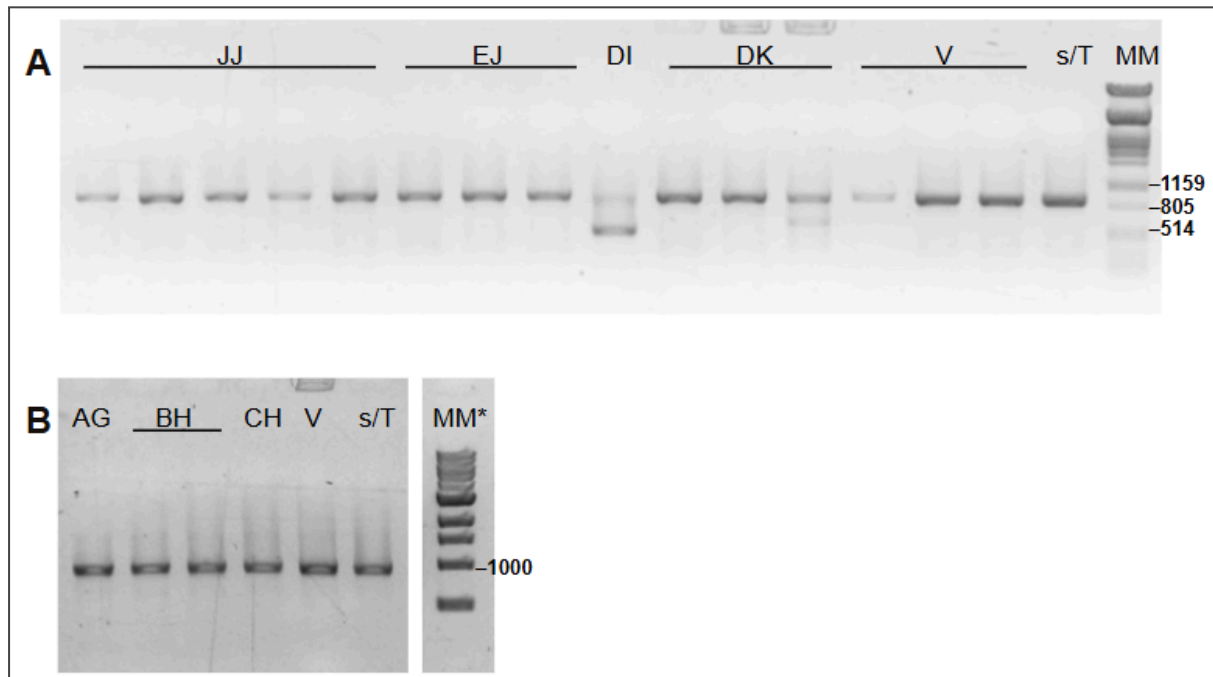


Figura 15. Genotipado de proCV1 en líneas de *Arabidopsis* proCV1:GUS transformadas con construcciones para edición génica. **(A)** Electroforesis en gel de agarosa 1 % para evidenciar las reacciones de PCR distal de muestras pool de ADN genómico de plantas transformadas con cada construcción. V: muestra de planta transformada con el pEXP VACÍO, sin gRNAs. s/T: muestra de *Arabidopsis* proCV1:GUS sin transformar. MM: marcador de peso molecular (λ -PstI). **(B)** Electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos amplificados por el PCR proximal, realizado a partir de un pool de ADN genómico de plantas transformadas con cada construcción. V: muestra de planta transformada con el pMR285-VACÍO, sin gRNAs. s/T: muestra de *Arabidopsis* proCV1:GUS sin transformar. MM*: marcador de peso molecular "1 kb DNA Ladder" de NEB. La figura fue recortada para omitir carriles con muestras irrelevantes para este análisis de resultados; la foto presentaba 20 carriles sembrados, de los cuales en la figura se muestran los carriles nro. 1-6 y nro. 20 (MM*).

5. Discusión

5.1. Rol de *CV1* en la senescencia temprana asociada a estrés abiótico

Este trabajo se centró en generar herramientas para alterar distintas regiones del promotor de *CV1*, como estrategia para interferir con la inducción del gen por estrés abiótico e incrementar la tolerancia al estrés hídrico de la soja. La alteración del promotor de *CV1* busca generar un knockdown del gen para modular su expresión bajo condiciones de estrés abiótico, alterando su capacidad responsiva frente a este tipo de señales.

Esta estrategia se apoya en los resultados propios y de otros grupos, que vinculan el aumento de expresión de *CV1* con la senescencia inducida por estrés abiótico y la disminución del rendimiento en distintas especies vegetales (Fleitas et al., 2023; Sade, Umnajkitikorn, et al., 2017; Wang & Blumwald, 2014). A su vez, estos estudios muestran que en *Arabidopsis* y en arroz, el silenciamiento (knockdown) del único gen que codifica una proteína de tipo CV, aumenta la tolerancia al estrés abiótico. Aportes respecto al silenciamiento de CV en arroz, demuestran un mejor rendimiento en estas plantas respecto a las salvajes; apoyando la hipótesis de los efectos beneficiosos de aumentar la estabilidad de los cloroplastos y retrasar la senescencia sobre el rendimiento del grano en cultivos bajo estrés hídrico. A su vez, estas plantas de arroz con CV silenciado, probaron mantener la asimilación de carbono y nitrógeno durante estrés abiótico, contrastando con la prematura removilización del nitrógeno en plantas salvajes bajo la misma condición, y su reducción en el rendimiento del grano (Sade, Umnajkitikorn, et al., 2017). En conjunto, estos resultados indican que la degradación de cloroplastos mediada por CV, se encuentra regulando en gran medida la asimilación de nitrógeno durante senescencia inducida por estrés (Sade, Umnajkitikorn, et al., 2017).

Este gen codifica para una proteína CV, cuya función descrita por primera vez en *Arabidopsis*, es la de interactuar con las las membranas tilacoidales del cloroplasto conduciendo a la formación de vesículas que transportan proteínas cloroplásticas hacia la vacuola para su degradación (Wang & Blumwald, 2014).

En *Arabidopsis*, la acumulación de la proteína CV en los cloroplastos, es resultado del aumento de expresión del gen bajo condiciones de estrés abiótico y senescencia (Wang & Blumwald, 2014). La investigación de esta vía de degradación de los cloroplastos en soja, condujo al descubrimiento de la existencia de dos genes parálogos, y al posterior hallazgo de la especialización funcional de *CV1* con su rol de respuesta a estrés (Fleitas et al., 2023; Gallino et al., 2018). Estos resultados abrieron la posibilidad de que en este trabajo, se

puedan desarrollar herramientas para modular la respuesta al estrés en soja mediante una regulación fina de la expresión de *CV1*, permitiendo intervenir específicamente en la senescencia inducida por estrés sin afectar el programa de senescencia natural de la planta.

La senescencia es crucial para la buena aptitud de la planta y su desarrollo, porque los nutrientes liberados de las hojas senescentes, son reubicados hacia otros tejidos jóvenes de la planta que se encuentran en desarrollo en el caso de plantas anuales, o reubicados y almacenados en el floema en el caso de las plantas perennes para su correcto crecimiento en la temporada siguiente (Lim et al., 2007). El inicio de la senescencia depende mayoritariamente del estadio de desarrollo de la planta, aunque también puede ser influenciada por factores endógenos y ambientales; la alteración de este proceso por dichas señales suele conducir a una reducción del rendimiento y calidad en cultivos, como se mencionó anteriormente (Huang et al., 2022).

Pero cuando este fenómeno de senescencia ocurre de forma temprana en el desarrollo, a consecuencia del estrés, el rendimiento en términos de grano se ve significativamente reducido, afectando la producción del cultivo. La senescencia prematura actúa como un mecanismo de escape que permite a la planta asegurar su descendencia; sin embargo, este proceso implica un compromiso que usualmente se traduce en una disminución en la cantidad y calidad de las semillas (Balazadeh et al., 2008; Humbeck, 2014; Lim et al., 2007; Zentgraf et al., 2021).

5.2. Estrategias para interferir en la senescencia temprana

Existen varios trabajos que buscaron interferir con la senescencia temprana inducida por estrés, a nivel de la degradación cloroplástica, con el fin de prolongar la actividad fotosintética en plantas y obtener plantas más tolerantes a la sequía (Board, 2013). Sin embargo, varias de las estrategias orientadas a intervenir con las vías de degradación del cloroplasto para aumentar la tolerancia al estrés fueron poco eficientes (James et al., 2018; Li et al., 2015). En conjunto, la evidencia sugiere que interferir tanto con la autofagia como con SAVs, no brinda mejoras consistentes en la tolerancia a la sequía, lo que resulta coherente teniendo en cuenta la importancia crítica que estas rutas tienen sobre el desarrollo y la adaptación de las plantas. (Domínguez & Cejudo, 2021; Jiang et al., 2020)

Por otro lado, trabajos en arroz de Rivero et al (2007) mostró que la expresión heteróloga del gen *IPT* (isopentiltransferasa), involucrado en la biosíntesis de citoquininas, bajo el control de un promotor inducible por senescencia (*pSARK*), generó plantas con mayor estabilidad de los cloroplastos y pérdidas mínimas en el rendimiento bajo condiciones

de estrés. (Rivero et al., 2007) silenciamiento de CV mediante microRNAs artificiales en plantas transgénicas de *Arabidopsis* demostró que, bajo estrés salino y oxidativo, la degradación de cloroplastos inducida por estrés se encontraba inhibida, con mayores tasas de supervivencia para las plantas con CV silenciado bajo condiciones de sequía (Wang & Blumwald, 2014).

Estudios más recientes realizados en tomate indican que la pérdida de función de CV por knockout, contribuye al mantenimiento de la capacidad fuente bajo senescencia inducida por estrés en tomate (Ahouvi et al., 2022).

Tanto en el caso del arroz pSARK-IPT como en *Arabidopsis* expresando microRNAs artificiales, las estrategias exitosas de manipulación de la senescencia temprana se basaron en la obtención de plantas transgénicas. (Rivero et al., 2007; Sade, Umnajkitikorn, et al., 2017; Wang & Blumwald, 2014). Dado las dificultades que impone el sistema regulatorio para la liberación de plantas transgénicas con fines comerciales, en este trabajo se buscó evaluar estrategias para interferir con la expresión de *CV1* de soja mediante edición génica del promotor, lo cual no involucra la presencia de transgenes en el genotipo mejorado final.

Esta característica resulta particularmente relevante desde una perspectiva aplicada, dado que facilita su eventual incorporación a programas de mejoramiento y su posterior comercialización.

5.3. Edición de proCV1 como estrategia de intervención sobre la senescencia temprana

La edición genética de regiones codificantes ha sido tradicionalmente la estrategia más utilizada para el estudio funcional de genes, aunque en muchos casos conduce a mutaciones knockout que eliminan completamente la función génica. Si bien este enfoque ha permitido identificar componentes clave de diversas rutas biológicas, su aplicación en caracteres complejos como la tolerancia al estrés abiótico ha mostrado limitaciones, debido a la aparición de efectos pleiotrópicos y alteraciones del desarrollo asociadas a la pérdida total de función (Domínguez & Cejudo, 2021; Jiang et al., 2020; Rodríguez-Leal et al., 2017; Tang et al., 2023). En contraste, la edición de regiones reguladoras, particularmente de promotores, permite modular la expresión génica de manera cuantitativa y condicional, sin afectar la integridad de la proteína codificada. Este tipo de intervención resulta de particular interés para el gen *CV1*, cuya sobreinducción bajo estrés contribuye a la activación prematura de la degradación cloroplástica.

Desde una perspectiva funcional y aplicada, la edición cis regulatoria ofrece la ventaja de un ajuste fino de los niveles de expresión, reduciendo la probabilidad de pleiotropía asociada a mutaciones en regiones codificantes. La modificación de elementos cis reguladores puede dar lugar a alelos con expresión diferencial que mimetizan variación natural, favoreciendo su estabilidad funcional y su potencial incorporación en programas de mejoramiento genético (Rodríguez-Leal et al., 2017). En el caso de *CV1*, la presencia en su promotor de múltiples elementos cis asociados a estrés abiótico y senescencia sugiere que su inducción depende de la integración de señales regulatorias específicas. En este contexto, la edición selectiva de dichos elementos permitiría desacoplar la activación de *CV1* de señales de estrés, potencialmente manteniendo niveles basales compatibles con el desarrollo normal y evitando la degradación prematura de los cloroplastos inducida por estrés (Fleitas et al., 2023; Wang & Blumwald, 2014).

Entre las estrategias disponibles para la edición de CREs en promotores, el sistema CRISPR-Cas9 se ha consolidado como una herramienta eficiente y versátil. En este trabajo se optó por su aplicación, apoyada en protocolos previamente optimizados por nuestro grupo, y se implementó una estrategia basada en el uso simultáneo de dos gRNAs con el objetivo de incrementar la probabilidad de generar mutaciones no silenciosas y deleciones de mayor tamaño en regiones específicas (Liu et al., 2017; Rodríguez-Leal et al., 2017). Esta aproximación resulta particularmente pertinente en promotores enriquecidos en AT, como pro*CV1*, donde la baja frecuencia de sitios PAM reconocibles por Cas9 (“NGG”) limitó el diseño gRNAs individuales para cada o la mayoría de CREs de interés. En este contexto, se contempla además el uso potencial de Cas12, cuya preferencia por secuencias PAM ricas en AT ha demostrado ser ventajosa para la edición de este tipo de regiones (Bandyopadhyay et al., 2020; Zetsche et al., 2015).

La estrategia planteada apunta a dilucidar el aporte funcional de CREs específicos mediante la correlación entre la eliminación de ciertas regiones definidas y la actividad del reportero GUS, evaluada a través de ensayos fluorimétricos, de plantas en condiciones de estrés hídrico. En particular, existe un interés destacado en los sitios de unión a factores NAC, dada la evidencia previa de interacción del factor NAC RD26 con el promotor de *CV* en *Arabidopsis* (Kamranfar et al., 2018). Asimismo, la abundancia de CREs asociados a la respuesta a auxinas plantea interrogantes sobre su funcionalidad individual o redundante, cuya evaluación contribuirá a una comprensión más fina de la arquitectura regulatoria de pro*CV1*.

5.4. Estructura de proCV1

El patrón de expresión diferencial de *CV1* y su parálogo *CV2*, es consistente con la presencia y abundancia de elementos cis reguladores relacionados al estrés, siendo estos más abundantes en el promotor de *CV1* que en el de *CV2* (Fleitas et al., 2023).

Adicionalmente, solo el promotor de *CV1* probó ser responsivo a hormonas típicamente vinculadas al estrés, como ABA, SA, Me-Ja, y ACC, apoyando el rol de este parálogo en la respuesta al estrés (Fleitas et al., 2023). La inducción de expresión por auxinas es mayor en *CV1* que en *CV2*, consistente con la abundancia de elementos responsivos a auxinas del promotor de *CV1* en comparación con *CV2*. (Fleitas et al., 2023) Las auxinas se producen en regiones de la planta en las que hay células jóvenes en desarrollo, y también se acumulan en lugares donde hay muerte celular programada del desarrollo (Brumos et al., 2018; Sheldrake, 2021). La regulación de los genes *CV* mediada por auxinas, sugiere que estos genes se transcriben activamente en tejidos en proceso de muerte ricos en auxinas, donde *CV* podría estar participando en la removilización de nitrógeno como consecuencia de la degradación de plástidos (Fleitas et al., 2023; Sheldrake, 2021).

El hecho de que *CV1* aumente su expresión bajo condiciones de estrés abiótico, y su función clave consista en el desmantelamiento de los cloroplastos para el reciclaje de sus recursos, confirma su rol fundamental en el desarrollo de una senescencia temprana como mecanismo de escape, permitiéndole a la planta en condiciones de estrés abiótico, asegurar descendencia antes de que condiciones más severas sucedan (Fleitas et al., 2023; Humbeck, 2014; Wang & Blumwald, 2014; Zentgraf et al., 2021).

El análisis *in silico* de la región promotora de *CV1* enfocado en la búsqueda de elementos cis reguladores asociados al estrés abiótico y senescencia, arrojó una lista de elementos que resulta consistente con su patrón de inducción bajo dichas condiciones.

Entre los CREs identificados se destacan sitios de unión para factores de transcripción de las familias NAC y WRKY, ampliamente reconocidas como reguladores centrales de la senescencia foliar y de la respuesta a estrés ambiental (Cao et al., 2023; Rushton et al., 2010).

Numerosos factores NAC actúan como reguladores positivos de la senescencia mediante la activación de genes asociados a senescencia (SAGs) y de genes implicados en la homeostasis redox (Mahmood et al., 2016; Podzimska-Sroka et al., 2015). En particular, se ha demostrado que el factor RD26 (Responsive to Desiccation 26), perteneciente a la familia de factores de transcripción NAC, se une directamente al promotor de *CV* en *Arabidopsis* y activa su expresión, integrando señales de estrés hídrico y senescencia (Kamranfar et al., 2018). Entre los factores de transcripción NAC, se encuentra el ORE1, regulador positivo de la senescencia en *Arabidopsis* y regulado positivamente por EIN2

(Ethylene Insensitive 2) (Cao et al., 2023). Ensayos de sobreexpresión de ORE1 en *Arabidopsis*, demostraron inducción temprana de la senescencia (Balazadeh et al., 2008).

De manera complementaria, los factores WRKY, que reconocen el motivo W-box, regulan positivamente la expresión de genes asociados a senescencia y estrés, funcionando como nodos de amplificación transcripcional que refuerzan la activación de programas degenerativos bajo condiciones adversas (Rushton et al., 2010).

La identificación de CREs vinculados a la señalización hormonal en proCV1 refuerza su rol como integrador de múltiples vías regulatorias. Se detectaron elementos asociados a EIN2 y EIN3 (Ethylene Insensitive 3), componentes clave de la vía de señalización del etileno, hormona estrechamente asociada a la inducción de la senescencia foliar. EIN3 actúa como regulador transcripcional maestro promoviendo la expresión de factores NAC pro-senescencia, tales como ORE1 (Oresara1), estableciendo un eje etileno–NAC que acelera la progresión de la senescencia (Zentgraf et al., 2021).

Asimismo, se identificaron elementos reconocidos por ERFs (Ethylene Response Factors), los cuales se unen a ERE (Ethylene-Response Element), y por factores de la superfamilia AP2/ERF (Apetala 2 / Ethylene-Responsive Factor), que incluye las subfamilias AP2, RAV (Related to ABI3/VP1), DREB (Dehydration-Responsive Element Binding protein) y ERF. Estos factores participan activamente en la regulación de genes inducidos por etileno, ABA y estrés hídrico, integrando señales hormonales y ambientales que, bajo condiciones prolongadas de estrés, contribuyen a la activación de la senescencia inducida (Cao et al., 2023; Mizoi et al., 2012; Sakuma et al., 2002; Xie et al., 2019).

Adicionalmente, el promotor de CV1 contiene CREs asociados a factores de transcripción bHLH (basic Helix-Loop-Helix), bZIP (basic Leucine Zipper), ARF (Auxin Response Factor) y Zinc-Finger C2H2, todos ellos involucrados en la regulación fina de respuestas al estrés y en la interacción entre distintas señales hormonales (Rushton et al., 2010).

Los factores bHLH y bZIP desempeñan un rol destacado en la señalización mediada por ABA (ácido abscísico), modulando tanto mecanismos de tolerancia al estrés hídrico como procesos de senescencia (Cao et al., 2023; Hao et al., 2021).

Los factores ARF, mediante su unión a elementos de respuesta a auxinas (Bouzroud et al., 2018), regulan procesos de crecimiento, desarrollo y adaptación al estrés, sugiriendo una integración entre señales de desarrollo y señales ambientales en la regulación de CV1.

Por su parte, los factores Zinc-Finger C2H2 han sido asociados a la regulación de genes implicados en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, la acumulación de osmolitos y la respuesta a ABA, actuando como moduladores directos de la tolerancia al estrés abiótico (Han et al., 2020; Kiełbowicz-Matuk, 2012).

Finalmente, la identificación de DREBs (Dehydration-Responsive Element Binding proteins) y de sus elementos blanco DRE/CRT (Dehydration-Responsive Element / C-Repeat Element), junto con la presencia del elemento STRE (Stress-Responsive Element), refuerza el carácter altamente sensible al estrés hídrico del promotor de *CV1* (Fleitas et al., 2023; Wang & Blumwald, 2014).

En conjunto, la combinación y redundancia funcional de estos CREs explican la fuerte inducción de *CV1* bajo condiciones de estrés abiótico y senescencia, y fundamentan su selección como blanco para estrategias de edición de promotores orientadas a desacoplar la degradación cloroplástica inducida por estrés, sin comprometer el desarrollo normal de la planta.

5.5. Uso de un sistema heterólogo

Este trabajo se centró en llevar a cabo las primeras etapas para la obtención de una colección de mutantes en distintas regiones del promotor de *CV1* de soja, usando el sistema CRISPR-Cas9, con el objetivo de identificar las regiones responsables de la inducción del gen vía estrés abiótico. El uso de *Arabidopsis thaliana* como sistema heterólogo para el análisis funcional de pro*CV1* representa una estrategia experimental ventajosa frente a la realización directa de estos ensayos en soja, particularmente en etapas exploratorias y comparativas, al permitir no solo la generación eficiente de múltiples eventos editados, sino también la evaluación directa de sus efectos funcionales *in vivo*.

En este trabajo se empleó una línea transgénica estable de *Arabidopsis* portadora de la construcción pro*CV1*:GUS, lo que permitió evaluar de manera reproducible la actividad del promotor y el impacto de distintas ediciones cis-regulatorias en un contexto genético controlado, posibilitando el análisis funcional de la regulación transcripcional en plantas vivas y bajo condiciones fisiológicamente relevantes. La elección de un sistema heterólogo se sustenta en la amplia conservación de los mecanismos transcripcionales asociados a estrés y senescencia en plantas superiores, así como en la presencia en *Arabidopsis* de los principales factores trans que reconocen los elementos cis identificados en pro*CV1* (Cao et al., 2023; Rushton et al., 2010). Bajo esta premisa, se plantea la hipótesis de que las ediciones introducidas en pro*CV1* en *Arabidopsis* podrían ser extrapolables a soja mediante la utilización de la misma combinación de gRNAs, permitiendo una transferencia racional de la estrategia una vez identificadas las modificaciones regulatorias más eficaces, sobre la base de su comportamiento funcional observado *in vivo*.

La transformación genética directa de soja presenta limitaciones técnicas y temporales significativas, incluyendo una baja eficiencia de transformación, protocolos

altamente laboriosos y tiempos prolongados para la obtención de líneas estables, lo que dificulta la evaluación simultánea de múltiples construcciones (Homrich et al., 2012; Paz et al., 2006). En este contexto, *Arabidopsis* ofrece ventajas sustanciales como modelo biológico, dado su corto ciclo de vida, alta eficiencia de transformación y la posibilidad de analizar un gran número de eventos independientes en un tiempo reducido (Clough & Bent, 1998). Estas características resultan particularmente relevantes considerando la necesidad de evaluar un conjunto amplio de construcciones editadas, permitiendo obtener información preliminar robusta sobre cuáles modificaciones del promotor se alinean mejor con el objetivo de reducir el impacto negativo del estrés hídrico antes de su implementación en un cultivo de interés agronómico como soja.

Adicionalmente, el pequeño tamaño de *Arabidopsis* posibilita el análisis de la expresión génica a nivel de la planta completa mediante ensayos histoquímicos de GUS (Vitha et al., 1995), en los cuales el sustrato X-Gluc precipita localmente permitiendo una resolución espacial detallada de la actividad del promotor, habilitando la visualización directa *in vivo* de los patrones de expresión derivados de las distintas ediciones cis regulatorias; un abordaje impracticable en especies de mayor porte como soja. Esta característica, sumada a la posibilidad de realizar ensayos fluorimétricos cuantitativos del reportero, facilita la evaluación comparativa de la actividad de proCV1 bajo distintas condiciones de estrés abiótico y tratamientos hormonales (Cervera, 2004). Asimismo, el reducido tamaño de las plantas permite analizar un número elevado de individuos en paralelo, incrementando la robustez estadística y la eficiencia experimental. En conjunto, estas ventajas posicionan al sistema heterólogo en *Arabidopsis* como una plataforma idónea para la evaluación funcional *in vivo* de ediciones cis reguladoras, con miras a su eventual aplicación en programas de mejoramiento genético orientados a la tolerancia al estrés en soja.

5.6. Desafíos metodológicos y oportunidades de mejora

La eficiencia de transformación de *Arabidopsis* obtenida con las distintas construcciones osciló aproximadamente entre 0,5 y 3 %, con variaciones entre construcciones. Si bien este rango se considera levemente bajo para el protocolo utilizado (Clough & Bent, 1998), resultó suficiente para los objetivos del trabajo. Esta eficiencia se vio compensada por la elevada cantidad de semillas T0 obtenidas, lo que permitió recuperar entre 2 y 15 plantas T0 por construcción, las cuales fueron posteriormente agrupadas en pooles para su análisis.

Con el objetivo de reducir tiempos de manipulación y optimizar el uso de recursos, se decidió inicialmente agrupar el material vegetal en pooles, provenientes de dos a cuatro

plantas T0 transformadas con una misma construcción. Esto permitió simplificar las etapas iniciales de genotipado, como la verificación de la presencia del transgén de *Cas9* y la detección preliminar de deleciones en proCV1 mediante PCR. En este sentido, el uso de pooles representó una aproximación para una etapa exploratoria del trabajo, orientada a detectar de manera preliminar la ocurrencia de eventos de edición. Sin embargo, el análisis de ADN genómico de a pool, requirió abrir los pooles en la generación T1, lo que incrementó considerablemente el número de plantas a analizar.

Por lo que en la práctica, este enfoque resultó menos eficiente de lo esperado, ya que la expansión del número de individuos en T1 superó el ahorro inicial de tiempo y recursos. Adicionalmente, la agrupación de a pooles puede enmascarar eventos de edición de baja frecuencia, particularmente relevantes en plantas T0. En función de estas limitaciones, se considera que para etapas posteriores sería más adecuado realizar el genotipado individual de plantas T0, trabajando con tandas más reducidas, lo que permitiría una identificación más directa y eficiente de eventos de edición relevantes. Esta estrategia, no obstante, queda planteada como una mejora a implementar en trabajos futuros.

El análisis preliminar de grandes deleciones en proCV1 mediante PCR indicó que, en la muestra pool DI (Figura 15A) se detectó una banda de menor tamaño compatible con una deleción en la región comprendida entre ambos gRNAs (D e I). Si bien este resultado no fue confirmado por secuenciación, el tamaño del amplicón sugiere con alta probabilidad la ocurrencia de dicho evento, cuya validación requerirá análisis adicionales.

La mayor intensidad relativa de la banda correspondiente al alelo consistente con una deleción, podría reflejar una mayor abundancia de este alelo en la muestra analizada. Sin embargo, dado que el ADN corresponde a muestras agrupadas de a grupos de plantas T0, esta observación debe interpretarse con cautela, ya que no permite inferir el estado de cigosis, resultando necesario el genotipado individual en generaciones siguientes para su confirmación.

Si bien en este trabajo se logró obtener líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con deleciones de gran tamaño, detectables mediante electroforesis en gel (Figura 15), la eficiencia global de edición podría ser aún optimizada. Estudios previos en *Arabidopsis* han demostrado que la exposición transitoria a 37 °C incrementa significativamente la actividad de escisión de SpCas9, aumentando la frecuencia de mutaciones inducidas (LeBlanc et al., 2018). Este efecto se obtiene mediante tratamientos térmicos breves y restringidos a la fase vegetativa, dado que exposiciones prolongadas o aplicadas durante la fase reproductiva promueven el aborto de botones florales (LeBlanc et al., 2018; Warner & Erwin, 2005). Considerando esto, la implementación de este tipo de inducción térmica emerge como una estrategia prometedora para ampliar la diversidad de eventos de edición obtenidos en futuras etapas del abordaje experimental.

5.7. Un abordaje híbrido para la identificación funcional de regiones cis-reguladoras

Tradicionalmente, la genética directa y la genética reversa han constituido enfoques complementarios para el estudio funcional de genes y su aplicación en el mejoramiento vegetal (Aklilu, 2021). En este trabajo, la estrategia adoptada no se ajusta estrictamente a ninguno de estos paradigmas clásicos, sino que propone un enfoque intermedio orientado a la identificación funcional de regiones regulatorias dentro de un promotor específico. Si bien las mutaciones introducidas mediante CRISPR-Cas se dirigen a un espacio regulatorio definido, la función específica de sus elementos cis reguladores no se encuentra completamente caracterizada. En este sentido, el abordaje no responde a una lógica de genética reversa pura, pero tampoco se ajusta a un enfoque de genética directa clásica, dado que no se realiza mutagénesis al azar a escala genómica.

La estrategia desarrollada combina componentes propios de ambos enfoques: por un lado, la introducción dirigida de mutaciones en una región de interés regulatorio; por otro, la posterior selección de variantes funcionalmente relevantes en función de un criterio fenotípico, definido en este caso por cambios en la actividad del promotor evaluados mediante un sistema reportero. Esta lógica híbrida permite integrar un componente de azar propio de la genética directa con una aproximación característica de la genética reversa, posibilitando la identificación de regiones cis regulatorias con impacto funcional sin requerir hipótesis previas cerradas sobre su contribución individual. En conjunto, este trabajo sienta las bases para el desarrollo de estrategias experimentales que permitan explorar de manera eficiente la arquitectura regulatoria de promotores asociados a caracteres complejos, aportando un marco conceptual transferible a futuros estudios orientados al mejoramiento genético.

6. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se avanzó en el desarrollo y puesta a punto de una estrategia para el análisis funcional del promotor del gen *CV1* de soja, basada en la edición dirigida de elementos cis-regulatorios (CREs) mediante CRISPR-Cas9 y el uso de *Arabidopsis thaliana* proCV1:GUS como sistema heterólogo de expresión. En este marco, se diseñaron gRNAs

dirigidos a distintas regiones del promotor en función de la presencia de CREs de interés, se generaron ocho construcciones génicas que permiten la expresión simultánea de dos gRNAs junto a Cas9, y se obtuvo al menos 1 línea transgénica por construcción. Los ensayos preliminares realizados permitieron identificar eventos de edición para al menos dos de las construcciones, cumpliendo así con los objetivos propuestos y estableciendo un sistema experimental funcional para evaluar el impacto de modificaciones regulatorias sobre la actividad del promotor. Estos resultados sientan las bases para identificar regiones del promotor con potencial involucramiento en la regulación de *CV1* en respuesta al estrés abiótico.

Desde una perspectiva conceptual, la edición de CREs emerge como una herramienta particularmente valiosa, ya que permite ampliar la diversidad genética de manera cualitativa y cuantitativa, generando series de alelos con variación gradual en la expresión génica, sin recurrir a mutaciones de pérdida completa de función (Rodríguez-Leal et al., 2017; Saeed et al., 2022). En este sentido, el abordaje empleado no solo contribuye a la comprensión fina de la arquitectura regulatoria del promotor de *CV1*, sino que también ofrece un marco experimental para modular su actividad, con el objetivo de interferir selectivamente en la senescencia inducida por estrés abiótico, manteniendo la senescencia natural y minimizando impactos negativos sobre el rendimiento. Este tipo de estrategias resulta especialmente relevante en un contexto en el que la frecuencia e intensidad de sequías y olas de calor continúan aumentando a escala global debido al cambio climático (*Summary for Policymakers — Global Warming of 1.5 °C*, s. f.), afectando de manera directa la productividad de cultivos clave como la soja.

Como perspectivas, los resultados obtenidos abren la posibilidad de profundizar el análisis de las líneas generadas mediante ensayos cuantitativos de actividad GUS, estudios bajo condiciones de estrés controlado y la caracterización detallada de las mutaciones introducidas en el promotor. A más largo plazo, la identificación de regiones regulatorias funcionalmente relevantes permitiría trasladar este conocimiento a la edición del promotor de *CV1* en soja, contribuyendo al desarrollo de variedades con mayor tolerancia al déficit hídrico. En este marco, el trabajo se inscribe dentro del contexto más amplio del mejoramiento vegetal mediante edición génica, con potencial para aportar a una intensificación agrícola más sostenible y resiliente de cara a los desafíos productivos y ambientales actuales (Mishra & Pandey, 2024), en un escenario donde estas tecnologías comienzan a contar con mayor aceptación social y marcos regulatorios más favorables (Ahmad, 2023).

Bibliografía

- Adeyinka, O. S., Tabassum, B., Koloko, B. L., & Ogungbe, I. V. (2023). Enhancing the quality of staple food crops through CRISPR/Cas-mediated site-directed mutagenesis. *Planta*, 257(4), 78. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04110-6>
- Ahmad, M. (2023). Plant breeding advancements with “CRISPR-Cas” genome editing technologies will assist future food security. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1133036>
- 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>
- Aklilu, E. (2021). Review on forward and reverse genetics in plant breeding. *All Life*, 14(1), 127-135. <https://doi.org/10.1080/26895293.2021.1888810>
- Bailey-Serres, J., Parker, J. E., Ainsworth, E. A., Oldroyd, G. E. D., & Schroeder, J. I. (2019). Genetic strategies for improving crop yields. *Nature*, 575(7781), 109-118. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1679-0>
- Balazadeh, S., Parlitz, S., Mueller-Roeber, B., & Meyer, R. C. (2008). Natural developmental variations in leaf and plant senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 10(s1), 136-147. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00108.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>
- Bandyopadhyay, A., Kancharla, N., Javalkote, V. S., Dasgupta, S., & Brutnell, T. P. (2020). CRISPR-Cas12a (Cpf1): A Versatile Tool in the Plant Genome Editing Tool Box for Agricultural Advancement. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.584151>
- Board, J. (2013). *A Comprehensive Survey of International Soybean Research: Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships*. BoD – Books on Demand.
- Bouzroud, S., Gouiaa, S., Hu, N., Bernadac, A., Mila, I., Bendaou, N., Smouni, A., Bouzayen, M., & Zouine, M. (2018). Auxin Response Factors (ARFs) are potential mediators of auxin action in tomato response to biotic and abiotic stress (*Solanum*

- lycopersicum). *PLOS ONE*, *13*(2), e0193517.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193517>
- Brumos, J., Robles, L. M., Yun, J., Vu, T. C., Jackson, S., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2018). Local Auxin Biosynthesis Is a Key Regulator of Plant Development. *Developmental Cell*, *47*(3), 306-318.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.022>
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J.-F., Wu, S.-H., Swidzinski, J., 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*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *42*(4), 567-585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02399.x>
- Burris, R. H., & Roberts, G. P. (1993). Biological nitrogen fixation. *Annual Review of Nutrition*, *13*, 317-335. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.13.070193.001533>
- Cameron, R. A., & Davidson, E. H. (2009). Flexibility of transcription factor target site position in conserved *cis*-regulatory modules. *Developmental Biology*, *336*(1), 122-135. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.09.018>
- Cao, J., Liu, H., Tan, S., Li, Z., 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). <https://doi.org/10.3390/ijms24119245>
- Carrow, R. N. (1996). Drought Avoidance Characteristics of Diverse Tall Fescue Cultivars. *Crop Science*, *36*(2), 371-377. <https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600020026x>
- Carter, T. E., Burton, J. W., Bowman, D. T., Cui, Z., Zhou, X., & Villagarcia, M. R. (2003). Registration of 'N7001' Soybean. *Crop Science*, *43*(3), 1125-1125. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1125>
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.-W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., Marè, C., Tondelli, A., & Stanca, A. M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, *105*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.07.004>
- Cervera, M. (2004). Histochemical and Fluorometric Assays for uidA (GUS) Gene Detection. En L. Peña (Ed.), *Transgenic Plants: Methods and Protocols* (pp. 203-213). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:203>
- Chakraborty, S., Pattanayak, A., Mandal, S., Das, M., & Roychowdhury, R. (2014). *An Overview of Climate Change: Causes, Trends and Implications* (pp. 3-29).
- Chandra, V., Bhattacharyya, S., Schmiedel, B. J., Madrigal, A., Gonzalez-Colin, C., Fotsing, S., Crinklaw, A., Seumois, G., Mohammadi, P., Kronenberg, M., Peters, B., Ay, F., &

- Vijayanand, P. (2021). Promoter-interacting expression quantitative trait loci are enriched for functional genetic variants. *Nature Genetics*, 53(1), 110-119.
<https://doi.org/10.1038/s41588-020-00745-3>
- Charlson, D. V., Bhatnagar, S., King, C. A., Ray, J. D., Sneller, C. H., Carter, T. E., & Purcell, L. C. (2009). Polygenic inheritance of canopy wilting in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 119(4), 587-594. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1068-4>
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merio, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11(2), 263-271.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043-5)
- 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>
- Clement, M., Lambert, A., Herouart, D., & Boncompagni, E. (2008). Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules. *Gene*, 426(1-2), 15-22.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.08.016>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 16(6), 735-743.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
- Concordet, J.-P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W242-W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Cotrina Cabello, G. G., Ruiz Rodriguez, A., Husnain Gondal, A., Areche, F. O., Flores, D. D. C., Astete, J. A. Q., Camayo-Lapa, B. F., Yapias, R. J. M., Jabbar, A., Yovera Saldarriaga, J., Salas-Contreras, W. H., & Cruz Nieto, D. D. (2023). Plant adaptability to climate change and drought stress for crop growth and production. *CABI Reviews*, 2023. <https://doi.org/10.1079/cabireviews.2023.0004>
- Do, P. T., Nguyen, C. X., Bui, H. T., Tran, L. T. N., Stacey, G., Gillman, J. D., Zhang, Z. J., & Stacey, M. G. (2019). Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2-1A and GmFAD2-1B genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. *BMC Plant Biology*, 19(1), 311. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1906-8>

- 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>
- Easterling, W., Aggarwal, P., Batima, P., Brander, K., Erda, L., Howden, M., Kirilenko, A., Morton, J., Soussana, J.-F., Schmidhuber, J., Tubiello, F., Antle, J., Baethgen, W., Barlow, C., Pdr, L., Chhetri, N., Craig, P., Cranage, J., Killmann, W., ... Kajfež-Bogataj, L. K. (s. f.). *Food, fibre and forest products*.
- El MGAP le puso números a un año terrible para la producción de soja*. (s. f.). El Observador. Recuperado 24 de febrero de 2025, de <https://www.elobservador.com.uy/nota/el-mgap-le-puso-numeros-a-un-ano-terrible-para-la-produccion-de-soja-202373212717>
- Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(4), 673-689. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>
- Fausser, F., Schiml, S., & Puchta, H. (2014). Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 79(2), 348-359. <https://doi.org/10.1111/tpj.12554>
- Fernie, A. R., & Yan, J. (2019). De Novo Domestication: An Alternative Route toward New Crops for the Future. *Molecular Plant*, 12(5), 615-631. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.03.016>
- Finalizó la sequía meteorológica 2020-2023 en todo el Uruguay | Inumet*. (s. f.). Recuperado 27 de enero de 2026, de <https://www.inumet.gub.uy/sala-de-prensa/noticias/finalizo-la-sequia-meteorologica-2020-2023-en-todo-el-uruguay>
- 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 Use of Whole Soybeans. (2008). En *Soybeans* (pp. 441-481). AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-64-6.50017-2>
- Foyer, C. H., Siddique, K. H. M., Tai, A. P. K., Anders, S., Fodor, N., Wong, F.-L., Ludidi, N., Chapman, M. A., Ferguson, B. J., Considine, M. J., Zabel, F., Prasad, P. V. V., Varshney, R. K., Nguyen, H. T., & Lam, H.-M. (2019). Modelling predicts that soybean is poised to dominate crop production across Africa. *Plant, Cell & Environment*, 42(1), 373-385. <https://doi.org/10.1111/pce.13466>
- 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>
- Ghorbel, M., Brini, F., Sharma, A., & Landi, M. (2021). Role of jasmonic acid in plants: The molecular point of view. *Plant Cell Reports*, 40(8), 1471-1494. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02687-4>
- Gregersen, P. L., Culetic, A., Boschian, L., & Krupinska, K. (2013). Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology*, 82(6), 603-622. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0013-8>
- 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), 101. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00378-5>
- Han, G., Lu, C., Guo, J., Qiao, Z., Sui, N., Qiu, N., & Wang, B. (2020). C2H2 Zinc Finger Proteins: Master Regulators of Abiotic Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00115>
- Hao, Y., Zong, X., Ren, P., Qian, Y., Fu, A., Hao, Y., Zong, X., Ren, P., Qian, Y., & Fu, A. (2021). Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transcription Factors Regulate a Wide Range of Functions in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22137152>
- Hartley, J. L. (2000). DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research*, 10(11), 1788-1795. <https://doi.org/10.1101/gr.143000>
- He, Y., Mudgett, M., & Zhao, Y. (2022). Advances in gene editing without residual transgenes in plants. *Plant Physiology*, 188(4), 1757-1768. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab574>
- Himelblau, E., & Amasino, R. M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*, 158(10), 1317-1323. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00608>
- Homrich, M. S., Wiebke-Strohm, B., Weber, R. L. M., & Bodanese-Zanettini, M. H. (2012). Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 (suppl)), 998-1010. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600015>
- Hörtensteiner, S. (2009). Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends in Plant Science*, 14(3), 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.01.002>
- Hörtensteiner, S., & Feller, U. (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 927-937. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.927>

- Huang, P., Li, Z., & Guo, H. (2022). New Advances in the Regulation of Leaf Senescence by Classical and Peptide Hormones. *Frontiers in Plant Science*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923136>
- Humbeck, K. (2014). Senescence in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(1), 1-3.
<https://doi.org/10.1007/s00344-013-9397-6>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429-5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- James, M., Poret, M., Masclaux-Daubresse, C., Marmagne, A., Coquet, L., Jouenne, T., Chan, P., Trouverie, J., & Etienne, P. (2018). SAG12, a Major Cysteine Protease Involved in Nitrogen Allocation during Senescence for Seed Production in Arabidopsis thaliana. *Plant & Cell Physiology*, 59(10), 2052-2063.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy125>
- Jiang, Z., Zhu, L., Wang, Q., & Hou, X. (2020). Autophagy-Related 2 Regulates Chlorophyll Degradation under Abiotic Stress Conditions in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4515. <https://doi.org/10.3390/ijms21124515>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jing, H.-C., Schippers, J. H. M., Hille, J., & Dijkwel, P. P. (2005). Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and OLD genes in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), 2915-2923.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri287>
- 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>
- Karavolias, N. G., Horner, W., Abugu, M. N., & Evanega, S. N. (2021). Application of Gene Editing for Climate Change in Agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.685801>
- 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>
- Khan, M., Rozhon, W., & Poppenberger, B. (2013). The Role of Hormones in the Aging of Plants—A Mini-Review. *Gerontology*, 60(1), 49-55.
<https://doi.org/10.1159/000354334>

- Kielbowicz-Matuk, A. (2012). Involvement of plant C₂H₂-type zinc finger transcription factors in stress responses. *Plant Science*, 185-186, 78-85.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.11.015>
- Kim, J., Woo, H. R., & Nam, H. G. (2016). Toward Systems Understanding of Leaf Senescence: An Integrated Multi-Omics Perspective on Leaf Senescence Research. *Molecular Plant*, 9(6), 813-825. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.017>
- Kneebone, W. R., Kopec, D. M., & Mancino, C. F. (1992). Water Requirements and Irrigation. *En Turfgrass* (pp. 441-472). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.2134/agronmonogr32.c12>
- Kumar, S., Thilagam, P., Shikha, D., Saikanth, D. R. K., Rahmani, U., Huded, S., & Panigrahi, C. K. (2023). Adapting Plant Protection Strategies to Meet the Challenges Posed by Climate Change on Plant Diseases: A review. *International Journal of Environment and Climate Change*, 13(12), 25-36.
<https://doi.org/10.9734/ijecc/2023/v13i123657>
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: Expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W171-W174.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>
- LeBlanc, C., Zhang, F., Mendez, J., Lozano, Y., Chatpar, K., Irish, V. F., & Jacob, Y. (2018). Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. *The Plant Journal*, 93(2), 377-386. <https://doi.org/10.1111/tpj.13782>
- Lee, J., Chin, J. H., Ahn, S. N., & Koh, H.-J. (2015). Brief History and Perspectives on Plant Breeding. En H.-J. Koh, S.-Y. Kwon, & M. Thomson (Eds.), *Current Technologies in Plant Molecular Breeding* (pp. 1-14). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-9996-6_1
- Lei, Y., Lu, L., Liu, H.-Y., Li, S., Xing, F., & Chen, L.-L. (2014). CRISPR-P: A Web Tool for Synthetic Single-Guide RNA Design of CRISPR-System in Plants. *Molecular Plant*, 7(9), 1494-1496. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu044>
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 325-327. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>
- Li, F., Chung, T., Pennington, J. G., Federico, M. L., Kaeppler, H. F., Kaeppler, S. M., Otegui, M. S., & Vierstra, R. D. (2015). Autophagic Recycling Plays a Central Role in Maize Nitrogen Remobilization. *The Plant Cell*, 27(5), 1389-1408.
<https://doi.org/10.1105/tpc.15.00158>

- Lim, P. O., Kim, H. J., & Gil Nam, H. (2007). Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 115-136. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316>
- Liu, L., Gallagher, J., Arevalo, E. D., Chen, R., Skopelitis, T., Wu, Q., Bartlett, M., & Jackson, D. (2021). Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR–Cas9 promoter editing of maize CLE genes. *Nature Plants*, 7(3), 287-294. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00858-5>
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(3), 292-302. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.01.002>
- Liu, Y., & Bassham, D. C. (2012). Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 215-237. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105441>
- Lu, Z., Ricci, W. A., Schmitz, R. J., & Zhang, X. (2018). Identification of cis-regulatory elements by chromatin structure. *Current Opinion in Plant Biology*, 42, 90-94. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.004>
- Luquez, V. (2001). Effects of the «Stay Green» Genotype GGd1d1d2d2 on Leaf Gas Exchange, Dry Matter Accumulation and Seed Yield in Soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Annals of Botany*, 87(3), 313-318. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1324>
- Ma, X., & Liu, Y. (2016). CRISPR/Cas9-Based Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Current Protocols in Molecular Biology*, 115(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.10>
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Yan, Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Yuanling, Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z., & Liu, Y.-G. (2015). A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, 8(8), 1274-1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
- 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>
- Manavalan, L. P., Guttikonda, S. K., Phan Tran, L.-S., & Nguyen, H. T. (2009). Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1260-1276. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp082>
- Markulj Kulundžić, A., Josipović, A., Matoša Kočar, M., Viljevac Vuletić, M., Antunović Dunić, J., Varga, I., Cesar, V., Sudarić, A., & Lepeduš, H. (2022). Physiological insights on soybean response to drought. *Agricultural Water Management*, 268, 107620. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107620>

- 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>
- 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>
- Michelfelder, A. J. (2009). Soy: A complete source of protein. *American Family Physician*, *79*(1), 43-47.
- Mishra, A., & Pandey, V. P. (2024). CRISPR/Cas system: A revolutionary tool for crop improvement. *Biotechnology Journal*, *19*(2), 2300298. <https://doi.org/10.1002/biot.202300298>
- Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science*, *80*.
- Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, Plant gene regulation in response to abiotic stress*, *1819*(2), 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.08.004>
- Morris, K., -Mackerness, S. A. -H., Page, T., John, C. F., Murphy, A. M., Carr, J. P., & Buchanan-Wollaston, V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal*, *23*(5), 677-685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00836.x>
- Munné-Bosch, S. (2025). Drought stress-induced leaf senescence in plants: How to detect it and why. *Annals of Botany*, mcaf157. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaf157>
- Pacesa, M., Pelea, O., & Jinek, M. (2024). Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies. *Cell*, *187*(5), 1076-1100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.01.042>
- Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C., & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *76*(2), 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.06.004>
- Pardo, E. M., Vellisce, G. R., Aguirrezabal, L., Pereyra Irujo, G., Rocha, C. M. L., García, M. G., Prieto Angueira, S., Welin, B., Sanchez, J., Ledesma, F., & Castagnaro, A. P. (2015). Drought Tolerance Screening Under Controlled Conditions Predicts Ranking of Water-Limited Yield of Field-Grown Soybean Genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *201*(2), 95-104. <https://doi.org/10.1111/jac.12106>

- Paz, M. M., Martinez, J. C., Kalvig, A. B., Fonger, T. M., & Wang, K. (2006). Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Reports*, *25*(3), 206-213. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0048-7>
- Peleg, Z., Reguera, M., Tumimbang, E., Walia, H., & Blumwald, E. (2011). Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnology Journal*, *9*(7), 747-758. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00584.x>
- Permyakova, N. V., Deineko, E. V., Permyakova, N. V., & Deineko, E. V. (2024). Crop Improvement: Comparison of Transgenesis and Gene Editing. *Horticulturae*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010057>
- Podzimska-Sroka, D., O'Shea, C., Gregersen, P. L., Skriver, K., 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>
- Priest, H. D., Filichkin, S. A., & Mockler, T. C. (2009). *Cis*-Regulatory elements in plant cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology, Cell signalling and gene regulation*, *12*(5), 643-649. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.016>
- Rasheed, A., Mahmood, A., Maqbool, R., Albaqami, M., Sher, A., Sattar, A., Bakhsh, G., Nawaz, M., Hassan, M. U., Al-Yahyai, R., Aamer, M., Li, H., & Wu, Z. (2022). Key insights to develop drought-resilient soybean: A review. *Journal of King Saud University - Science*, *34*(5), 102089. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102089>
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLOS ONE*, *8*(6), e66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>
- Razzaq, A., Wani, S. H., Saleem, F., Yu, M., Zhou, M., & Shabala, S. (2021). Rewilding crops for climate resilience: Economic analysis and *de novo* domestication strategies. *Journal of Experimental Botany*, *72*(18), 6123-6139. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab276>
- Reguera, M., Peleg, Z., Abdel-Tawab, Y. M., Tumimbang, E. B., Delatorre, C. A., & Blumwald, E. (2013). Stress-Induced Cytokinin Synthesis Increases Drought Tolerance through the Coordinated Regulation of Carbon and Nitrogen Assimilation in Rice. *Plant Physiology*, *163*(4), 1609-1622. <https://doi.org/10.1104/pp.113.227702>
- Ritter, A., Iñigo, S., Fernández-Calvo, P., Heyndrickx, K. S., Dhondt, S., Shi, H., De Milde, L., Vanden Bossche, R., De Clercq, R., Eeckhout, D., Ron, M., Somers, D. E., Inzé, D., Gevaert, K., De Jaeger, G., Vandepoele, K., Pauwels, L., & Goossens, A. (2017). The transcriptional repressor complex FRS7-FRS12 regulates flowering time and

- growth in Arabidopsis. *Nature Communications*, 8(1), 15235.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15235>
- Rivero, R. M., Gimeno, J., Van Deynze, A., Walia, H., & Blumwald, E. (2010). Enhanced Cytokinin Synthesis in Tobacco Plants Expressing PSARK::IPT Prevents the Degradation of Photosynthetic Protein Complexes During Drought. *Plant and Cell Physiology*, 51(11), 1929-1941. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq143>
- Rivero, R. M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., & Blumwald, E. (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19631-19636. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709453104>
- Rivero, R. M., Shulaev, V., & Blumwald, E. (2009). Cytokinin-Dependent Photorespiration and the Protection of Photosynthesis during Water Deficit. *Plant Physiology*, 150(3), 1530-1540. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139378>
- Rizzo, G., & Baroni, L. (2018). Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. *Nutrients*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/nu10010043>
- Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z. H., Man, J., Bartlett, M. E., & Lippman, Z. B. (2017). Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell*, 171(2), 470-480.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.030>
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., & Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15(5), 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.006>
- Sade, N., del Mar Rubio-Wilhelmi, M., Umnajkitikorn, K., & Blumwald, E. (2017). Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 69(4), 845-853. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx235>
- Sade, N., Umnajkitikorn, K., Rubio Wilhelmi, M. D. 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>
- Saeed, Sumbul, Usman, B., Shim, S.-H., Khan, S. U., Nizamuddin, S., Saeed, Sundus, Shoaib, Y., Jeon, J.-S., & Jung, K.-H. (2022). CRISPR/Cas-mediated editing of *cis*-regulatory elements for crop improvement. *Plant Science*, 324, 111435. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111435>
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3), 998-1009. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6299>

- Schwarzer, W., & Spitz, F. (2014). The architecture of gene expression: Integrating dispersed *cis*-regulatory modules into coherent regulatory domains. *Current Opinion in Genetics & Development, Developmental mechanisms, patterning and evolution*, 27, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.03.014>
- Sheldrake, A. R. (2021). The production of auxin by dying cells. *Journal of Experimental Botany*, 72(7), 2288-2300. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab009>
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M., Hakimi, S. M., Mo, H., & Habben, J. E. (2017). ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 207-216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12603>
- Sui, X., Zhang, T., & Jiang, L. (2021). Soy Protein: Molecular Structure Revisited and Recent Advances in Processing Technologies. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12(Volume 12, 2021), 119-147. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-062220-104405>
- Summary for Policymakers—Global Warming of 1.5 °C. (s. f.). Recuperado 18 de noviembre de 2025, de <https://www.ipcc.ch/sr15/chapter/spm/>
- Swinnen, G., De Meyer, M., Pollier, J., Molina-Hidalgo, F. J., Ceulemans, E., Venegas-Molina, J., De Milde, L., Fernández-Calvo, P., Ron, M., Pauwels, L., & Goossens, A. (2022). The basic helix–loop–helix transcription factors MYC1 and MYC2 have a dual role in the regulation of constitutive and stress-inducible specialized metabolism in tomato. *New Phytologist*, 236(3), 911-928. <https://doi.org/10.1111/nph.18379>
- Tang, Q., Wang, X., Jin, X., Peng, J., Zhang, H., & Wang, Y. (2023). CRISPR/Cas Technology Revolutionizes Crop Breeding. *Plants*, 12(17), 3119. <https://doi.org/10.3390/plants12173119>
- Tang, X., & Zhang, Y. (2023). Beyond knockouts: Fine-tuning regulation of gene expression in plants with CRISPR-Cas-based promoter editing. *New Phytologist*, 239(3), 868-874. <https://doi.org/10.1111/nph.19020>
- Telles, T. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2023). Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil. *Environmental Technology & Innovation*, 31, 103158. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103158>
- Turner, N., Wright, G. C., & Siddique, K. (2000). Adaptation of Grain Legumes (Pulses) to Water-Limited Environments. *Advances in Agronomy*, 71, 193-231. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(01\)71015-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(01)71015-2)
- Vitha, S., Benes, K., Phillips, J. P., & Gartland, K. M. (1995). Histochemical GUS analysis. *Methods in Molecular Biology*, 44, 185-193. <https://doi.org/10.1385/0-89603-302-3:185>

- Wang, C., Hu, S., Gardner, C., & Lübberstedt, T. (2017). Emerging Avenues for Utilization of Exotic Germplasm. *Trends in Plant Science*, 22(7), 624-637.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.002>
- 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>
- Warner, R. M., & Erwin, J. E. (2005). Naturally occurring variation in high temperature induced floral bud abortion across Arabidopsis thaliana accessions. *Plant, Cell & Environment*, 28(10), 1255-1266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01361.x>
- Wittkopp, P. J., & Kalay, G. (2012). Cis-regulatory elements: Molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nature Reviews Genetics*, 13(1), 59-69. <https://doi.org/10.1038/nrg3095>
- Wolters, H., & Jürgens, G. (2009). Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics*, 10(5), 305-317.
<https://doi.org/10.1038/nrg2558>
- Xiao, Q., Huang, X., Zhang, Y., Xu, W., Yang, Y., Zhang, Q., Hu, Z., Xing, F., Sun, Q., Li, G., & Li, X. (2022). The landscape of promoter-centred RNA-DNA interactions in rice. *Nature Plants*, 8(2), 157-170. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01089-4>
- Xie, Z., Nolan, T. M., Jiang, H., & Yin, Y. (2019). AP2/ERF Transcription Factor Regulatory Networks in Hormone and Abiotic Stress Responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00228>
- Yang, Q., Du, T., Li, N., Liang, J., Javed, T., Wang, H., Guo, J., & Liu, Y. (2023). Bibliometric Analysis on the Impact of Climate Change on Crop Pest and Disease. *Agronomy*, 13(3), 920. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030920>
- Yuan, X., Li, S., Chen, J., Yu, H., Yang, T., Wang, C., Huang, S., Chen, H., & Ao, X. (2024). Impacts of Global Climate Change on Agricultural Production: A Comprehensive Review. *Agronomy*, 14(7), 1360. <https://doi.org/10.3390/agronomy14071360>
- Zamir, D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), 983-989. <https://doi.org/10.1038/35103590>
- Zeevaart, J. a. D., & Creelman, R. A. (1988). Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. *Annual Review of Plant Biology*, 39(Volume 39, 1988), 439-473.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.002255>
- Zentgraf, U., Andrade, A. G., Doll, J., Zentgraf, U., Andrade, A. G., & Doll, J. (2021). Editorial for Special Issue "Leaf Senescence" in Plants. *Plants*, 10(8).
<https://doi.org/10.3390/plants10081490>
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., &

- Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(3), 759-771.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- Zhang, K., Xia, X., Zhang, Y., & Gan, S. (2012). An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 69(4), 667-678. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2011.04821.x>
- Zhao, L., Zhang, H., Zhang, B., Bai, X., & Zhou, C. (2012). Physiological and Molecular Changes of Detached Wheat Leaves in Responding to Various Treatments^F. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(8), 567-576.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01139.x>
- Zia, R., Nawaz, M. S., Siddique, M. J., Hakim, S., & Imran, A. (2021). Plant survival under drought stress: Implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. *Microbiological Research*, 242, 126626.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126626>

Anexo

Abreviaciones

ABA: ácido abscísico

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxílico

ADN: ácido desoxirribonucleico

AP2: Apetala 2

ARF: Auxin Response Factor

ARN: ácido ribonucleico

AuxRE: Auxin Response Element

bHLH: basic helix–loop–helix

bZIP: basic leucine zipper

Cas9: CRISPR-associated protein 9

C2H2: zinc-finger tipo C2H2

CRE: cis-regulatory element

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRT: C-repeat element

CV: Chloroplast Vesiculation

CV1: Chloroplast Vesiculation 1

CV2: Chloroplast Vesiculation 2

CVV: Chloroplast-degradation vesicular pathway

DRE: Dehydration-Responsive Element

DREB: Dehydration-Responsive Element-Binding protein

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EIN2: Ethylene Insensitive 2

EIN3: Ethylene Insensitive 3

ERE: Ethylene-Response Element

ERF: Ethylene Response Factor

gRNA: guide RNA

GUS: β -glucuronidasa

HRFA: High-Resolution Fragment Analysis

IAA: ácido indolacético

IPT: isopentil transferasa

JA: ácido jasmónico

MS: Murashige and Skoog

NAC: NAM, ATAF1/2, CUC2

OD600: densidad óptica a 600 nm

PAM: Protospacer Adjacent Motif

PCR: Polymerase Chain Reaction

proCV1: promotor de CV1

RUBISCO: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa

RNasa: ribonucleasa

RT-qPCR: Reverse Transcription quantitative PCR

SA: ácido salicílico

SAVs: Senescence-Associated Vacuoles

SpCas9: Streptococcus pyogenes Cas9

STRE: Stress-Responsive Element

TAE: Tris-Acetato-EDTA

UV: ultravioleta

W-box: WRKY transcription factor binding site

WT: wild type

Lista de cebadores utilizados en PCR

Tabla Anexo. Lista con todos los cebadores usados en los experimentos. Se indican sus nombres seguidos de su secuencia.

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
M13F-40	GTTTTCCCAGTCACGACG
RevA	AAACCGATGACCCTCTTACCTTAA
RevB	AAACCCATTATTTACTTTTAATTA
RevC	AAACTGCATCTTGGATGAAAATTT
RevD	AAACTTCGGATATTAGCGTTACGA
RevE	AAACTTGCCATCGCACTGACCAAG
RevG	AAACTTAGTTCTAAGTCAAGACTT
RevH	AAACATTGCTTGCCGTGTTTGCAG
RevI	AAACCTTCACTCTTCTTCTGGATT
RevJ	AAACAGCTTATATCATGCATATTT
RevK	AAACAAATTAAGGCACTGAAATAC
FwA	ATTGTTAAGGTAAGAGGGTCATCG
FwB	ATTGTAATTAAGTAAATAATGG
FwC	ATTGAAATTTTCATCCAAGATGCA

FwD	ATTGTCGTAACGCTAATATCCGAA
FwE	ATTGCTTGGTCAGTGCATGGCAA
HSPterFw	CAAATAAATAGCTTGTGTGCTTAAGTTTGTG
HygRev	GATGTTGGCGACCTCGTATT
FwCas9	CAACTACCACCACGCTCACG
RevCas9	CCCTCCCTTATCCCACACG
5FAM-FwproCV1-902	TCCGAATGGAGCCGGTCTTTG
Proximal_Rev	GGTGAGAGTTGAGTTGAG
5FAM-Fw proCV1-1195	GGTCTCGCTATCCAATTGTAGCTCTT

Secuencia genómica de proCV1 con los gRNAs diseñados

En rojo, se indican los diferentes gRNAs, con su respectivo nombre en superíndice y resaltando en amarillo.

> -1500 pb pro*GmCV1*

TTATAGATGATAAAACAGTCAAACCTACTCCTCTTTATGCCGACAAAGCTATTAGCTCCGT
TGGATAAGAAGTACGTTGCAAGCATGATTATTGTGCGACGAAATTCCAAAAATATAAGTTGTT
TATTCCTCGTCTTTTGTCCAAACGTACTAGCTTGATTATAAAAGTAGCCATCTTGTTTACA
TGTTAACCTAAAATTTTACTTGTTTTGTAAAGCAATTACCCATATCTTTCTATAAATGAATG
TAATCGTGGAAGTACTTTTGAAAAGTATTTGATGTTAGGCTTAAACTTTGGTCTCGCTATCC
AATTGTAGCTCTTTTTTCCCCCATTAAAACATGCTCCTTATCAAATATAGAAAATACTTTC
ATCATTTAAAATATTATTTTTTATAAAAATAGT^AAAATATGCATGATATAAGCT^TTGGTTACATGT
TTCGCAGACTTTATTTGGTGTAAAATATAAACTTCTATTGTTGTCCCTAATGGTTTGATCA
AAACGGTGTGTCAATGAA^CTTGGTTCAGTGCATGGCAA^BGGGGCGAGGAAAGCATATAGGAA
AAAAAGAAAAACGAAATTGAAC^TCGTAAACGCTAATATCCGAA^DTGGAGCCGGTCTTTGTATT
TTTTTTTTTCTTCATAATATTGGGGGACAATTTTGACCCACAAAAATTCATAAACAACCTCA
TTTTTCAAAAACGTGTTCTTTTCGGATGTCTGTCAATTTTCAGAGTTTTCGGTAAGTGAAGATATT
AATCAGATTAAATTA^GTATTTTCAGTGCCTTAATTT^KAGGTTTAATTTGATTATTTAATTCTTT
AAATTAATTTAATTTGTTTTTTCAGTTTAAATAAGAAATTATACTTTGTGATAAGTAATTTT
AAATCATCGAAAATACACATATCACCGAAAAATAAATTAATTTAAAAAATTAGATGATCAA
TTAAAATTAAAAAAATTAATTGATGAAATTAATCGATTTTAAAAAATAAAAAATAAAATGA
AAGTTACGGAATTGAAATATCTA^AAATCCAGAAGAAGAGTGAAG^TGGGAACTTGTTTAATCGG
TTAGTTTCCCTATTACGAAATTTGTTTACATAATTTTTTCAATGAATCCTCTTGTTTGAAC
TTACATAAGTTTGTGATCGAGGAAGTCC^AAATTTTTCATCCAAGATGCA^CTGGAGAGACTGTGACA
AGCGTGTCTCTACTGGGCAACGCGAGATTG^CTGCAAACACGGCAAGCAAT^HAGGTAGCACCA
AAAACAAGATGCTAAACTCAACCAAT^TAATTTAAAGTAAATAATG^GTGGCTTTGCCATTTGG

AATACGCCTCTTCCACTTGTCCAAACAATAACTCCCACTTTTTTCGATCTCCTAATTACTAT
TTTACATTTCAAGCTTTTCTGCTTCCTCATATCTCTCTATATATTGCTTCCT**TTAGTTCTAA**
GTCAAGACTT^GTTATAA**TTAAGGTAAGAGGGTCATCG**^ATGGAAGGATTTATAAATTTTCTCAA
CTCAACTCTCACC