

Informe final publicable de proyecto

Contribución de las rutas vesiculares de degradación de componentes celulares en la senescencia natural de la soja y en el contenido de proteína en grano.

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172268

Fecha de cierre de proyecto: 01/05/2025

FLEITAS BELAMENDIA, Andrea Luciana (Responsable Técnico - Científico)

CASTRO NOVELLE, María Alexandra (Investigador)

LASCANO, Ramiro (Investigador)

QUERO CORRALLO, Gastón Eduardo (Investigador)

VIDAL, Sabina (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

La senescencia es la última etapa en la vida de una planta. Durante este proceso, los nutrientes acumulados se redistribuyen hacia las partes reproductivas, como las semillas. Este reciclaje es fundamental para asegurar un buen rendimiento en los cultivos. En particular, el nitrógeno, que se encuentra mayormente en forma de proteínas dentro de las hojas, debe ser degradado para ser reutilizado. Los cloroplastos, responsables de la fotosíntesis, contienen la mayoría de estas proteínas, por lo que su descomposición es clave.

Aunque la senescencia natural es necesaria, condiciones adversas como la sequía pueden adelantar este proceso, lo que reduce la producción. Por eso, muchos investigadores buscan formas de hacer que las plantas resistan el estrés sin afectar su desarrollo normal. Sin embargo, si se retrasa la senescencia de forma general, también se puede afectar el proceso natural, lo cual puede ser perjudicial. Por eso, estas estrategias deben aplicarse con mucho cuidado.

La soja, uno de los cultivos más importantes del mundo, sufre especialmente por la falta de agua durante su crecimiento en verano. Nuestro equipo estudió genes involucrados en la degradación de proteínas durante el estrés. Descubrimos dos genes clave, llamados CV1 y CV2. CV1 se activa principalmente cuando la planta está bajo estrés, mientras que CV2 actúa en la senescencia natural. Esto nos llevó a pensar que, si eliminamos CV1, podríamos hacer que la planta resista mejor la sequía sin alterar su ciclo normal.

Con esta idea, generamos plantas de soja editadas genéticamente sin el gen CV1. Estas plantas se desarrollan normalmente, florecen y producen granos como siempre. Ahora estamos analizando si realmente resisten mejor el estrés por falta de agua. Los resultados podrían ayudar a mejorar el rendimiento y la calidad de la soja frente al cambio climático.

Ciencias Agrícolas / Biotecnología Agropecuaria / Biotecnología Agrícola y Biotecnología Alimentaria / Biología Molecular Vegetal

Palabras clave: Fuente-fosa / Rutas vesiculares de degradación / Vesiculación Cloroplástica /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

La soja es la principal oleaginosa producida a nivel mundial, y la mayor parte de su producción ocurre en el continente americano (USDA, 2020). La sequía es la principal restricción que limita la producción de cultivos y la soja no es la excepción debido a que se cultiva durante el verano principalmente con prácticas agrícolas de secano (Cattivelli, 2008). El rendimiento de un cultivo está definido por todo su ciclo de vida y se ve afectado por la cantidad de luz interceptada por las hojas y la acumulación de biomasa a través de la fotosíntesis. La sequía afecta tanto la acumulación de biomasa como el crecimiento de las plantas, afectando la fotosíntesis y la transpiración (Tardieu, 2018). La sequía también puede desencadenar una senescencia prematura, lo que compromete aún más la acumulación de biomasa en las especies cultivadas (Reguera, 2013).

La senescencia es la última etapa del desarrollo de la planta y generalmente culmina con la muerte a nivel celular, de tejido, de órgano o de toda la planta. Es un proceso complejo que involucra varios eventos moleculares y fisiológicos controlados a nivel genético y modificados por las condiciones ambientales. Durante este proceso, las plantas reciclan los nutrientes desde sus órganos de origen hasta sus órganos reproductivos (Gepstein, 2013). Durante la senescencia de la hoja, los cloroplastos, que contienen el 75% del nitrógeno (N) de la hoja (50% del cual lo aporta RubisCO; Díaz, 2005), son los primeros organelos en degradarse, mientras que las mitocondrias y el núcleo permanecen activos hasta la culminación de la muerte celular para permitir la expresión de genes y la producción de energía metabólica que permite la progresión de la senescencia (Buchanan, 2005). En este proceso se produce la degradación de la clorofila, proteínas y lípidos. Las membranas de los tilacoides son una fuente muy abundante de carbono (C) que se removiliza. El N aparece principalmente en forma de proteínas, por lo que los pasos de proteólisis son esenciales para la removilización. El reciclaje de N es especialmente importante durante la etapa

reproductiva (James, 2019).

Varios insultos pueden desencadenar la senescencia prematuramente. La senescencia prematura inducida por estrés es la principal causa de pérdidas de biomasa y de llenado de grano, debido a la pérdida de la capacidad fotosintética. No solo afecta negativamente el rendimiento y la calidad de las especies cultivables, sino que también es responsable de la corta vida poscosecha de muchas hortalizas, frutas y flores. Estos factores potencian las pérdidas mundiales de alimentos y representan una importante amenaza para la seguridad alimentaria (Reguera, 2013).

Retrasar la senescencia se ha utilizado como estrategia para mejorar la tolerancia al estrés ambiental (Rivero, 2007; Reguera, 2013; Sade, 2018). Se ha demostrado que la senescencia de la hoja se puede retrasar en plantas de tabaco transgénicas que expresan isopenteniltransferasa (IPT), una enzima clave para la síntesis de citoquinina (CK), bajo el control de promotores inducibles por senescencia. En condiciones de privación de agua, las plantas montaron una poderosa respuesta de aclimatación, con estimulación de la tasa fotosintética, mayor eficiencia en el uso del agua (WUE) y pérdidas mínimas de rendimiento, incluso cuando el riego alcanzó el 30% del requerimiento óptimo (Rivero, 2007). La estimulación de la producción de CK bajo el control de promotores inducibles por senescencia mejora la captación de ROS y promueve el mantenimiento de la capacidad fotosintética (Rivero, 2010; Ha, 2012) gracias a un aumento en la estabilidad de los cloroplastos (Rivero, 2009).

Dentro de los mecanismos que operan para degradar los componentes celulares, la autofagia es el más estudiado. Se han caracterizado dos tipos de autofagia: micro y macroautofagia. En la microautofagia, las pequeñas vesículas citosólicas son engullidas por invaginaciones del tonoplasto, formando pequeñas vesículas intravacuolares que luego son degradadas por hidrolasas vacuolares (Klionsky, 1999). En la macroautofagia (a partir de ahora, autofagia), los componentes citosólicos son engullidos por una estructura especializada de doble membrana, el autofagosoma, que transporta los componentes reciclables a la vacuola (Xie, 2015). Varios componentes de la maquinaria autofágica se han identificado en plantas (Doelling, 2002; Hanaoka, 2002; Thompson, 2005; Phillips, 2008; Li, 2015; Wang, 2017; Svenning, 2011; Vanhee, 2011; Zientara-Rytter, 2011; Liu, 2012; Michaeli, 2014; Rogov, 2014; Marshall, 2015; Li, 2012; Kilonsky, 2014). Los RCB, por Rubisco Containing Bodies, son vesículas autofágicas que transportan proteínas del estroma del cloroplasto a la vacuola (Chiba, 2003; Izumi, 2011).

Un segundo mecanismo que opera en la degradación de proteínas cloroplásticas está mediado por vacuolas asociadas a la senescencia (SAV). Mientras que los autofagosomas se encuentran en hojas y raíces, los SAV solo aparecen en células que contienen cloroplastos (Otegui, 2005). Al igual que los RCB, las SAV contienen proteínas cloroplásticas como RubisCO y GS2 (Martínez, 2008). Además, se han detectado algunas proteínas tilacoidales, como PsaA y Lhcgs, en SAV, pero no se han encontrado proteínas PSII, como D1 o proteínas antena PSII (LHCII) (Martínez, 2008; Gomez, 2019). Las SAV muestran una alta actividad proteolítica, no constituyendo solo vesículas de transporte sino que son compartimentos líticos en sí mismos. En estos compartimentos se acumula la cisteína proteasa SAG12 (Senescence associated gene 12), entre otras proteasas (Otegui, 2005; Buet, 2019). Recientemente, se demostró que los SAV también participan en la degradación de la clorofila durante la senescencia (Gomez, 2019).

Se han caracterizado otros dos tipos de vesículas de tráfico de proteínas cloroplásticas: a saber, mediadas por ATI1 (ATG8 interacting protein 1) y CV (Chloroplast Vesiculation). La proteína ATI1 participa en el tráfico vesicular desde el retículo endoplásmico (Honig, 2012) y los cloroplastos (Michaeli, 2014) hacia la vacuola central. ATI1 se puede detectar dentro de los plástidos y también en el citosol, asociado con vesículas que contienen una GFP de localización cloroplástica (ATI1-PS). La generación de ATI-PS no requiere una maquinaria autofágica funcional, pero se requiere autofagia funcional para la internalización en la vacuola central (Michaeli, 2014). ATI1 interactúa con varias proteínas cloroplásticas, muchas de las cuales se encuentran en los tilacoides. Entre ellas, varias están involucrados en la fotosíntesis: LHCA4, PsbS, PrxA, FNR1 y APE1 (Michaeli, 2014).

La vía de vesiculación de cloroplastos, descrita más recientemente, involucra una proteína llamada CV, que

participa en la senescencia natural y la senescencia inducida por estrés. La proteína CV se encuentra en los cloroplastos donde interacciona con otras proteínas, principalmente tilacoidales. La vía de degradación mediada por CV es independiente de la autofagia y permanece activa en mutantes atg5 (Wang y Blumwald, 2014). CV provoca la formación de vesículas dentro del cloroplasto, llamadas CCV (CV que contiene vesículas), que se desprenden del cloroplasto y se mueven hacia la vacuola central. La sobreexpresión de CV constitutiva es letal. No obstante, la sobreexpresión de CV inducible promueve la formación de CCV y acelera la senescencia, lo que afecta el contenido de proteínas de los fotosistemas (PsaB, PsaA, PsbO) y el estroma (GS2). Además, el silenciamiento de CV promueve la estabilidad de los cloroplastos y retrasa la senescencia inducida por el estrés (Wang y Blumwald, 2014; Sade, 2018).

Es interesante la existencia de varios sistemas vesiculares aparentemente independientes para la degradación de proteínas. Esto podría deberse a que cada sistema es responsable de la degradación de proteínas específicas, lo que otorga a la célula flexibilidad para degradar de forma independiente el estroma o las proteínas tilacoides o las proteínas PSI frente a PSII en diferentes momentos dependiendo, por ejemplo, de las condiciones ambientales (Buet, 2019).

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

En este trabajo, se estudiaron las rutas vesiculares de degradación de proteínas de soja y se caracterizó preliminarmente los genes CV (GmCV). En ese trabajo, estas respuestas fueron estudiadas en condiciones de estrés hídrico. Se pudo evidenciar que la ruta CV es la que mayor contribución tendría en la removilización de nutrientes durante el estrés. Asimismo, se determinó que soja presenta dos genes CV con regulación marcadamente diferente, lo que sugiere cierta especialización funcional (Fleitas et al., 2023).

Nos proponemos estudiar cuál es la contribución de estas rutas durante la senescencia natural y determinar si existe alguna correlación entre la preponderancia de alguna de estas rutas y el contenido de proteína en grano. Asimismo buscamos evaluar si es posible eliminar uno de los genes CV de soja, el cual presenta un claro perfil de respuesta a estrés, para generar plantas con senescencia retrasada en condiciones de estrés hídrico pero cuya senescencia natural se encuentre inalterada.

El objetivo general de este proyecto consiste en determinar cuál es la contribución de las rutas vesiculares que participan en la degradación de componentes celulares durante la senescencia natural de la soja. Por un lado buscamos evaluar si existe una correlación entre qué ruta se encuentra más representada y el contenido de proteína en el grano. En este sentido, se compararán dos genotipos de soja del mismo grupo de madurez y rendimiento similar, pero cuyo contenido de proteína en grano es contrastante. Se analizará progresión de la senescencia natural en la etapa reproductiva de plantas de soja nodulada y se analizarán simultáneamente las rutas vesiculares de degradación. Asimismo, con el fin de profundizar en el rol de los genes CV de soja, proponemos evaluar si es posible eliminar uno de los genes CV de soja, GmCV1, el cual presenta un claro perfil de respuesta a estrés, para generar plantas con senescencia retrasada en condiciones de estrés pero cuya senescencia natural se encuentre inalterada.

Objetivo específico 1:

Determinar si existe una correlación entre la activación de todas o alguna de las rutas vesiculares de degradación de componentes celulares en los distintos órganos de la planta, con las relaciones fuente-fosa y el contenido de

proteína en el grano.

Objetivo específico 2:

Determinar si la eliminación del gen GmCV1 repercute retrasando la senescencia inducida por estrés, sin afectar la senescencia natural.

Metodología/Diseño del estudio

El primero de los objetivos de este trabajo consistió en evaluar si existe una correlación entre las rutas vesiculares de degradación de componentes celulares y el contenido de proteína en grano. El abordaje inicialmente previsto consistía en partir de dos genotipos de soja del mismo grupo de madurez y rendimiento similar proveniente de una misma población de RILs y analizar la progresión de la senescencia en plantas de soja nodulada durante su estadio reproductivo y analizando simultáneamente las rutas vesiculares.

Sin embargo, esta población de RILs no se pudo conseguir, y se trabajó con 10 variedades con contenido de proteína en grano contrastante: SJC13621, SJC13625, SJC14511, DM 6.8i, 5958 RSF IPRO, SJC14508, NA 5509 RG, GE 590 CI, 62R63 RSF, NA 5909 RG. Se analizó el contenido de proteína en tres zonas de producción, y todos los genotipos se crecieron en cámara de cultivo para observar su crecimiento. Las plantas se crecieron en invernadero utilizando un fotoperíodo de 16 h de luz y un régimen de luz de 1000 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta alcanzar estadios fenológicos R5-R7, correspondientes a etapas de llenado de grano. Las plantas fueron inoculadas con *Bradyrhizobium elkanii* al momento de la siembra y en etapas vegetativas tempranas (7-14 días luego de la siembra). Se determinó que la fenología avanzara de manera similar y que los parámetros fotosintéticos y de transpiración fueran similares entre genotipos. Se seleccionaron tres genotipos para realizar la toma de muestras. Se crecieron los genotipos PI 458.256 (contenido de proteína: 44.6 %, origen: Japón), ENREI (contenido de proteína: 44.7 %, origen: Corea) y 5351 RSF (contenido de proteína: 37.1 %, origen: Grupo Don Mario, Argentina) hasta el estadio reproductivo R6. Se realizó la toma de muestras de nódulos, raíz, tallos, hojas, vainas para realizar medidas de expresión génica y bioquímicas en plantas en estadio R6 y de plantas en estadio vegetativo V3. Estas muestras serán utilizadas para estudiar el avance de la senescencia, las relaciones fuente-fosa y para realizar estudios de expresión génica para determinar la expresión de genes relacionados a las distintas rutas de degradación de componentes celulares.

El segundo objetivo consistió en determinar si las plantas editadas para GmCV1 presentan una senescencia retrasada en condiciones de estrés pero mantienen inalterada su senescencia natural. Para abordar este objetivo se han generado plantas transgénicas de la variedad Williams que contienen una construcción que permite la expresión de la proteína Cas9 optimizada para su expresión en soja y tres RNAs guía que dirigen la acción de la proteína hacia el gen GmCV1. Las plantas fueron genotipadas para determinar la presencia de mutaciones en GmCV1. Se realizaron extracciones de ADN de las plantas regeneradas (T1) y se analizó la presencia de mutaciones en el locus mediante HRFA (high resolution fragment analysis). En las plantas knock out, se observó la senescencia natural y próximamente se continuará con el genotipado de las próximas generaciones y se realizarán ensayos de estrés hídrico para determinar si las plantas editadas presentan mayor tolerancia al estrés.

Resultados, análisis y discusión

Se obtuvieron diez variedades de soja de grupo de madurez similar pero de contenido de proteína en grano contrastante (5 de alto contenido de proteína, y 5 de bajo contenido de proteína). Todos los genotipos se crecieron en cámara de cultivo para observar su crecimiento. Se determinó que la fenología avanzara de manera similar y que los parámetros fotosintéticos y de transpiración fueran similares entre genotipos. Se seleccionaron tres genotipos para realizar la toma de muestras. Se crecieron los genotipos PI 458.256 (contenido de proteína: 44.6 %, origen: Japón), ENREI (contenido de proteína: 44.7 %, origen: Corea) y 5351 RSF (contenido de proteína: 37.1 %, origen: Grupo Don Mario, Argentina) hasta el estadio reproductivo R6. Se realizó la toma de muestras de nódulos, raíz, tallos, hojas, vainas para realizar medidas de expresión génica y bioquímicas en plantas en estadio R6 y de plantas en estadio vegetativo V3. No obstante, algunas de estas muestras se perdieron debido a problemas eléctricos en Facultad de Ciencias, por lo que se tuvo que realizar nuevos ensayos y no fue posible realizar las medidas que

estaban programadas en el lapso de este proyecto.

Se analizaron las diferentes líneas transgénicas regeneradas a partir de embriones somáticos bombardeados, pero aunque se obtuvieron varias líneas resistentes a higromicina, no se pudo determinar la presencia de las mutaciones en las plantas regeneradas ni la presencia de las construcciones completas lo que puede atribuirse a fraccionamiento de las construcciones debido al proceso de bombardeo. Entendiendo de que sería extremadamente difícil obtener plantas editadas utilizando esta estrategia de transformación se realizaron actividades no previstas. Como forma alternativa de profundizar en el rol del gen CV1 en soja y se procedió a generar una construcción que permite la expresión de la Cas9 y de los sgRNAs en soja pero que presenta además un gen reportero DsRED, lo que permite la detección de raíces transgénicas en el sistema de expresión transitorio de hairy roots mediado por Agrobacterium rhizogenes. Se puso a punto la transformación de soja mediada por A. rhizogenes y se regeneraron plantas químéricas con raíces transgénicas y editadas y parte aérea silvestre. En este tipo de sistema es posible estudiar el rol de CV en procesos asociados a la raíz, como la percepción del estrés hídrico y la nodulación. Se determinó la presencia de mutaciones en las raíces transgénicas mediante HRFA. Se determinó que los tres sgRNAs en la construcción son eficientes para promover cortes en el locus de CV1, obteniendo raíces editadas con una eficiencia del 80 %.

Asimismo, se realizó una pasantía en la empresa LaSemilla, albergada en la Universidad Nacional de Seúl para ganar conocimiento sobre la transformación de soja mediada por Agrobacterium tumefaciens. Se realizaron tres ensayos de transformación, con 245, 240 y 229 explantes, respectivamente, transformando un total de 714 medias semillas, utilizando el protocolo de transformación de Paz et al., 2006, Plant Cell Rep 25:206-213 y modificado por Yeon-Hee Lee, LaSemilla, Universidad Nacional de Seúl, Corea del Sur. Para estos ensayos se obtuvieron 18, 29 y 2 plantas transgénicas, representando porcentajes de transformación del 7.3, 12 y 0.87 %. En este último experimento el bajo porcentaje fue causado por una gran contaminación. Aún así, la eficiencia global de transformación fue del 6.9 %, lo cual es un porcentaje elevado y acorde a los protocolos reportados. 35 de estas plantas presentaron mutaciones en el gen GmCV1 observadas mediante HRFA, lo que representa un porcentaje de edición del 71.4 %. Esto permite evidenciar la enorme ventaja que presenta la transformación mediada por agrobacterium por sobre la biolística para llevar adelante la edición génica en soja. Las plantas editadas no presentan diferencias fenotípicas respecto a las plantas silvestres, su senescencia natural, floración y llenado de semillas, transcurre con normalidad. Próximamente se evaluará la respuesta a estrés en plantas en las que se haya logrado separar el transgen, es decir, sean editadas pero no transgénicas.

Es importante destacar que estas actividades transformación mediadas por Agrobacterium tumefaciens y rhizógenes, no eran tareas inicialmente previstas en este proyecto y fueron muy costosas desde el punto de vista del tiempo, pero constituyen resultados fundamentales e insumos valiosos para el trabajo futuro de nuestro grupo. Un protocolo optimizado para la transformación genética de la soja puede también repercutir positivamente sobre el trabajo realizado por el programa de mejoramiento de la soja del INIA.

Finalmente, pero no menos importante, este proyecto permitió la publicación del artículo: "Functional specialization of chloroplast vesiculation (CV) duplicated genes from soybean shows partial overlapping roles during stress-induced or natural senescence". En este estudio, encontramos que la expresión de CV1 se incrementó diferencialmente por el estrés hídrico en genotipos contrastantes de soja que presentan fenotipos de marchitamiento lento (tolerantes) o rápido (sensibles). CV1 alcanzó niveles de inducción más altos en plantas de marchitamiento rápido, lo que sugiere una correlación negativa entre la expresión de CV1 y la tolerancia a la sequía. En cambio, los genes de autofagia (ATG8) y ATI-PS (ATI1) se indujeron a niveles más altos en plantas de marchitamiento lento, lo que respalda un papel pro-supervivencia de estos genes en la respuesta de la soja al estrés hídrico. La función biológica de los genes CV de soja en la degradación de cloroplastos fue confirmada mediante el análisis del efecto de la sobreexpresión condicional de fusiones CV2-FLAG sobre la acumulación de proteínas cloroplásticas específicas. La especificidad funcional de CV1 y CV2 se evaluó mediante el análisis de la actividad de sus promotores en *Arabidopsis* transgénica que expresaba el gen reportero GUS bajo el control de los promotores de CV1 o CV2. El promotor de CV1 respondió principalmente a estímulos abióticos (hiperosmolaridad, salinidad y estrés oxidativo), mientras que el promotor de CV2 fue predominantemente activo durante la senescencia natural. Ambos promotores respondieron fuertemente a la auxina, pero solo CV1 respondió a otras

hormonas relacionadas con el estrés, como ABA, ácido salicílico y metil jasmonato. Además, la expresión de CV2 inducida por oscuridad, a diferencia de CV1, fue fuertemente inhibida por citoquinina, lo que indica similitudes en la regulación de CV2 con la expresión informada de los genes CV en *Arabidopsis* y arroz. Finalmente, reportamos la expresión de los genes CV1 y CV2 en raíces de soja y *Arabidopsis* transgénica, lo que sugiere un papel de las proteínas codificadas en los plastidios de raíz. En conjunto, los resultados indican roles diferenciales para CV1 y CV2 en el desarrollo y en las respuestas al estrés ambiental, y señalan a CV1 como un posible blanco para la edición genética orientada a mejorar el rendimiento del cultivo bajo condiciones de estrés sin afectar el desarrollo natural.

Conclusiones y recomendaciones

El objetivo general de este proyecto consistía en determinar cuál es la contribución de las rutas vesiculares que participan en la degradación de componentes celulares durante la senescencia natural de la soja y específicamente 1- determinar si existe una correlación entre la activación de todas o alguna de las rutas vesiculares de degradación de componentes celulares en los distintos órganos de la planta, con las relaciones fuente-fosa y el contenido de proteína en el grano, y 2- determinar si la eliminación del gen GmCV1 repercute retrasando la senescencia inducida por estrés, sin afectar la senescencia natural.

El primer objetivo no alcanzó a cumplirse. Si bien sí se pudo evaluar diferentes variedades de soja de grupo de madurez similar pero de contenido de proteína en grano contrastante (5 de alto contenido de proteína, y 5 de bajo contenido de proteína) en cámara, determinando que que la fenología avanzara de manera similar y que los parámetros fotosintéticos y de transpiración fueran similares entre genotipos. Se seleccionaron tres genotipos para realizar la toma de muestras. Se crecieron los genotipos PI 458.256 (contenido de proteína: 44.6 %, origen: Japón), ENREI (contenido de proteína: 44.7 %, origen: Corea) y 5351 RSF (contenido de proteína: 37.1 %, origen: grupo Don Mario, Argentina) hasta el estadio reproductivo R6. Se realizó la toma de muestras de nódulos, raíz, tallos, hojas, vainas para realizar medidas de expresión génica y bioquímicas en plantas en estadio R6 y de plantas en estadio vegetativo V3. No obstante, algunas de estas muestras se perdieron debido a problemas eléctricos en Facultad de Ciencias, por lo que se tuvo que realizar nuevos ensayos y no fue posible realizar las medidas que estaban programadas en el lapso de este proyecto.

Por otra parte, el objetivo 2 pudo cumplirse parcialmente. Para este objetivo era esencial contar con plantas editadas para el gen GmCV1. Si bien contábamos con plantas transgénicas que habían sido transformadas por biobalística, en el proceso de genotipado se hizo evidente que aunque las plantas regeneradas eran resistentes al antibiótico con el que se las estaba seleccionando, no habían logrado incorporar las mutaciones deseadas en los genes CV, lo que seguramente estuviera causado por el fraccionamiento de las construcciones. Luego de optimizar la transformación de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, fue posible obtener varias plantas en las que la edición del gen GmCV1 fue confirmada. La senescencia natural de estas plantas transcurre con normalidad, su floración y producción vainas no se vio afectada por la edición del gen. Es necesario aún realizar la segregación del transgen para poder continuar con el análisis de la senescencia natural e inducida por estrés en profundidad. Aunque no se logró alcanzar el objetivo a completitud, la generación de estas plantas editadas constituyó un aprendizaje muy valioso. Luego de haber intentado realizar edición génica en soja mediante dos metodologías de transformación diferentes, biológica de embriones somáticos y transformación de eje cotiledonar mediada por *Agrobacterium*, es importante enfatizar que la selección de la metodología de transformación es fundamental para alcanzar el éxito. La transformación mediada por *Agrobacterium* puede ser más laboriosa que la biológica, pero prácticamente no hay fraccionamiento de las construcciones y el número de copias insertado en el genoma es menor, lo que facilita la edición génica y la segregación posterior de las construcciones.

Los objetivos de este trabajo siguen vigentes y guían el trabajo a realizarse a continuación ya que este trabajo permitió generar todos los insumos de material vegetal que eran necesarios.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Functional specialization of chloroplast vesiculation genes from soybean shows partial overlapping roles during stress-induced or natural senescence	Fleitas Andrea, Luciana, Castro Alexandra, Blumwald Eduardo, Vidal Sabina.	10.3389/fpls.2023.1184020	https://hdl.handle.net/20.500.12381/3282	Finalizado

Referencias bibliográficas

- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, et al. Plant J (2005) 42: 567-585.
- Buet AM, Costa L, Martínez DE, Guiamet JJ. Front Plant Sci (2019) 10: doi: 10.3389/fpls.2019.00747.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, et al. Field Crops Res. (2008) 105: 1-14.
- Chang TG, Zhu XG. J Exp Bot (2017) 68 (16): 4417-4431.
- Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, et al. Plant Cell Physiol (2003) 44(9): 914-921.
- Collier R, Tegeder M. Plant J. (2012) 72(3):355-67.
- Diaz C, Purdy S, Christ A, et al. Plant Physiol (2005) 138: 898-908.
- Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, et al. (2002) J Biol Chem 277(36): 33105-33114.
- Fleitas AL, Castro A, Blumwald E, Vidal S. (2023) Front Plant Sci. DOI 10.3389/fpls.2023.1184020
- Gallino JP, Ruibal C, Casaretto E, et al. Front Plant Sci (2018) 9:262. doi: 10.3389/fpls.2018.00262.
- Garneau MG, Lu MZ, Grant J, Tegeder M. Plant Physiol. (2021) 187(4):2134-2155.
- Gepstein S, Glick BR. Plant Mol Biol (2013) 82: 623-633.
- Gong YH, Zhang J, Gao JF, et al. J Agron Crop Sci (2005) 191: 292-299.
- Gomez FM, Carrión CA, Costa ML, et al. Plant J (2019) 99(3): 465-477.
- Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. TRENDS Plant Sci (2012) 17 (3): 172-179.
- Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, et al. Plant Physiol (2002) 129: 1181-1193.
- Honig A, Avin-Wittenberg T, Ufaz S, Galili G. Plant Cell (2012) 24: 288-303.
- Islam MM, Ishibashic Y, Nakagawad ACS, et al. J Plant Physiol (2016) 192: 71-74.
- Izumi M, Ishida H. Plant Signal Behav (2011) 6(5): 685-687.
- James M, Masclaux-Daubresse C, Marmagne A, et al. Front Plant Sci (2019) 9: doi: 10.3389/fpls.2018.01998.
- Klionsky DJ, Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. Annu Rev Cell Dev Biol (1999) 15: 1-32.

- Li F, Vierstra RD. Trends Plant Sci (2012) 17: 526-537.
- Li F, Chung T, Pennington JG, et al. Plant Cell (2015) 27: 1389-1408.
- Liu Y, Bassham DC. Annu Rev Plant Biol. (2012) 63: 215-237.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Methods (2001) 25, 402–408.
- Lu MZ, Carter AM, Tegeder M. J Plant Physiol. (2022) 269:153613.
- Lu MZ, Snyder R, Grant J, Tegeder M. Plant J. (2020) 101(1):217-236.
- Madoka Y, Tomizawa K, Mizoi J, et al. Plant Cell Physiol (2002) 43: 1518-1525.
- Marshall RS, Li F, Gemperline DC, et al. Mol Cell (2015): doi/10.1016/j.molcel.2015.04.023.
- Martínez DE, Costa ML, Gomez FM, et al. Plant J (2008) 56: 196-206.
- Michaeli S, Honig A, Levanony H, et al. Plant Cell (2014) 26, 4084-4101.
- Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, et al. Plant J (2005) 41: 831-844.
- Pardo EM, Vellicce GR, Aguirrezaabal L, et al. J Agron Crop Sci (2014) 201: 95-104.
- Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K. Plant Cell Rep. 2006 doi: 10.1007/s00299-005-0048-7.
- Pélissier HC, Tegeder M. Funct. Plant Biol. (2007) 34, 282–291.
- Phillips A, Suttangkakul A, Vierstra RD. Genetics (2008) 178: 1339-1353.
- Reguera M, Peleg Z, Abdel-Tawab YM, et al. Plant Physiol (2013) 163: 1609-1622.
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, et al. Proc Natl Acad Sci U S A (2007), 104(49): 19631-19636.
- Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E. Plant Physiol (2009), 150:1530-1540.
- Rivero RM, Gimeno J, Van Deynze A, et al. Plant Cell Physiol (2010) 51(11): 1929-1941.
- Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Mol Cell (2014) 53: 167-178.
- Sade N, Umnajkitikorn K, Rubio Wilhelmi M, et al. J Exp Bot (2018) 69(4): 867-878.
- Svenning S, Lamark T, Krause K, Johansen T. Autophagy (2011) 7: 993-1010.
- Tardieu F, Simonneau T, Muller B. Annu Rev Plant Biol (2018) 69: 733-759.
- Tegeder M, Masclaux-Daubresse C. New Phytol (2017) 217: 35-53.
- Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD. Plant Physiol (2005) 138: 2097-2211.
- Urquhart AA, Joy KW. Plant Physiol. (1981) 68, 750–754.
- USDA, Foreign agricultural service, 2020 World Agricultural Production Report.
<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>
- USDA research service: <https://npgstest2.agron.iastate.edu/gringlobal/AccessionDetail?id=1353192>.
- Vanhee C, Zapotoczny G, Masquelier D, et al. Plant Cell (2011) 23: 785-805.
- Vogels GD, Van der Drift C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. Anal Biochem. (1970) 33(1):143-57.
- Wang S, Blumwald E. Plant Cell (2014) 26: 4875-4888.
- Wang L, Liu Y, Feng S, et al. Front Plant Sci (2017) 8, 616, doi: 10.3389/fpls.2017.00616.
- Xie Q, Michaeli S, Peled-Zehavi H, Galili G. TRENDS Plant Sci (2015) 20(5): 264-265.
- Zhang L, Garneau MG, Majumdar R, Grant J, Tegeder M. Plant J. (2015) 81(1):134-46.
- Zientara-Rytter K, Lukomska J, Moniuszko G, et al. Autophagy (2011) 7: 1145-1158.

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)

