



**BIOTECNOLOGÍA APLICADA  
AL MEJORAMIENTO  
GENÉTICO DE LA SOJA**

SEPTIEMBRE 2018

SERIE  
FPTA-INIA

**68**

# **BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA SOJA**

## **FPTA - 309**

### **Responsable del proyecto:**

Sabina Vidal

### **Institución ejecutora:**

Facultad de Ciencias

### **Equipo de trabajo:**

Dr. Juan Pablo Gallino, Facultad de Ciencias, UdelaR  
Lic. Yaily Rivero, Facultad de Ciencias, UdelaR  
Dra. Cecilia Ruibal, Facultad de Ciencias, UdelaR  
Mag. Luciana Fleitas, Facultad de Ciencias, UdelaR  
Dra. Alicia Castillo, INIA-Las Brujas  
Ing. Agr. Sergio Ceretta, INIA-La Estanzuela  
Mag. Esteban Casaretto, Facultad de Agronomía, UdelaR  
Dr. Omar Borsani, Facultad de Agronomía, UdelaR  
Dra. Sabina Vidal, Facultad de Ciencias, UdelaR

**Título:** Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de la soja

**Responsable técnico del proyecto:** Sabina Vidal

**Institución ejecutora:** Facultad de Ciencias

**Equipo técnico de trabajo:**

Dr. Juan Pablo Gallino. Facultad de Ciencias. UdelaR

Lic. Yaily Rivero, Facultad de Ciencias, UdelaR

Dra. Cecilia Ruibal, Facultad de Ciencias. UdelaR

Mag. Luciana Fleitas, Facultad de Ciencias. UdelaR

Dra. Alicia Castillo, INIA-Las Brujas

Ing. Agr. Sergio Ceretta, INIA-La Estanzuela

Mag. Esteban Casaretto, Facultad de Agronomía. UdelaR

Dr. Omar Borsani, Facultad de Agronomía. UdelaR

Dra. Sabina Vidal. Facultad de Ciencias. UdelaR

Este proyecto fue Financiado por:

- Fondo Multilateral de Inversiones del Banco Interamericano de Desarrollo (FOMIN-BID - ATN/ME-13562-UR): “Conservación del capital natural en la nueva agricultura”
- Fondo de Promoción de la Tecnología Agropecuaria (INIA-FPTA) n° 327 «Sustentabilidad ambiental y económica en predios agrícola-ganaderos: un sistema de indicadores objetivos aplicable en el campo»

**Serie:** FPTA N° 68

**ISBN:** 9978-9974-38-409-5

© 2018, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA  
Andes 1365, Piso 12. Montevideo, Uruguay  
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Este libro no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

---

## Integración de la Junta Directiva

**D.M.T.V., Ph.D. José Luis Repetto** - Presidente

**Ing. Agr., Mag. Mariana Hill** - Vicepresidenta



**Ing. Agr. Jaime Gomes de Freitas**

**Ing. Agr. Jorge Peñaricano**



**Ing. Agr. Pablo Gorriti**

**Ing. Agr. Alberto Bozzo**





## **FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA**

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos.

De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.



## Índice general

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>ANTECEDENTES</b> .....	12
<b>OBJETIVOS</b> .....	12
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	13
<b>1. Optimización de métodos biológicos y físicos para la transformación de soja</b> .....	13
1.1 Transformación de soja mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	13
1.2 Transformación de soja por bombardeo de partículas .....	15
1.2.1 Puesta a punto del protocolo con un genotipo de referencia .....	16
1.2.2 Evaluación y selección de genotipos embriogénicos de soja .....	17
<b>2. Construcción de un sistema de vectores para de transformación para la generación de intragénicos en soja</b> .....	18
2.1 Selección de promotores para la expresión constitutiva de los genes candidatos .....	18
2.2 Identificación de promotores de soja inducibles por déficit hídrico .....	19
2.3 Componentes y ensamblado de vectores para biolística .....	21
2.3.1 Sistema cre/lox para eliminar las secuencias no deseadas del genoma .....	21
2.3.2 Módulo de selección de células transformadas .....	21
2.3.3 Delimitación de la secuencia a escindir post-transformación .....	22
2.3.4 Evaluación de vectores .....	22
2.4 Generación de vectores para transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	24
<b>3. Obtención y caracterización genotípica de plantas de soja transformadas con genes asociados a tolerancia a sequía</b> .....	25
<b>CONCLUSIONES</b> .....	26
<b>Anexo 1: Protocolo optimizado de transformación de soja mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> .....	28
<b>Anexo 2: Protocolo optimizado para transformación de soja por Biolística</b> .....	29
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	33





**Responsable técnico del proyecto:** Sabina Vidal

**Institución ejecutora:** Facultad de Ciencias

**Equipo técnico de trabajo:**

Dr. Juan Pablo Gallino, Facultad de Ciencias, UdelaR

Lic. Yaily Rivero, Facultad de Ciencias, UdelaR

Dra. Cecilia Ruibal, Facultad de Ciencias, UdelaR

Mag. Luciana Fleitas, Facultad de Ciencias, UdelaR

Dra. Alicia Castillo, INIA-Las Brujas

Ing. Agr. Sergio Ceretta, INIA-La Estanzuela

Mag. Esteban Casaretto, Facultad de Agronomía, UdelaR

Dr. Omar Borsani, Facultad de Agronomía, UdelaR

Dra. Sabina Vidal, Facultad de Ciencias, UdelaR

# BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA SOJA

FPTA 309

Período de ejecución:

Junio – Junio 2018

## INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycine max* L.) es uno de los cuatro cultivos de mayor importancia a nivel mundial, y junto con el maíz, el arroz y el trigo aporta cerca de las dos terceras partes de las calorías en la dieta humana (Tilman *et al.*, 2011, Ray *et al.*, 2013). En Uruguay, el área del cultivo de soja creció ininterrumpidamente ocupando actualmente una área de 1,4 millones de hectáreas. Sin embargo, este crecimiento drástico en área no ha sido acompañado por un aumento de productividad, la cual se encuentra estancada en aproximadamente 2000 kg/ha, un valor sensiblemente menor al alcanzado en Argentina, Brasil, Paraguay y EEUU.

Entre los factores ambientales que más inciden en el desarrollo y rendimiento del cultivo de la soja está la sequía (Fuganti-Pagliarini *et al.*, 2017, Hufstetler *et al.*, 2007). El déficit hídrico reduce los rendimientos y restringe las zonas cultivables con soja a aquellas donde existe competencia con otras especies alimenticias comercialmente importantes. A modo de ejemplo, la sequía ocurrida en 2010/11 fue la causante del registro más bajo de productividad de soja (1.788 kg/ha), siendo estos valores de rendimiento incluso mayores a los que se prevé alcanzar en 2018 (DIEA). Tomando en cuenta las previsiones ambientales ligadas al cambio climático global, es esperable que la vulnerabilidad del cultivo continúe

umentando y afectando su productividad. Dado el impacto económico que la ocurrencia de sequía tiene sobre la producción de soja en Uruguay y en la región, aumentar los rendimientos bajo condiciones de estrés hídrico es actualmente una prioridad para los programas de mejora de este cultivo.

En la última década se han realizado importantes esfuerzos para incrementar la productividad en soja en condiciones de sequía. Las respuestas de tolerancia al estrés hídrico son en general de naturaleza compleja y resultan de la combinación de varios caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que involucran la participación de muchos genes. Por consiguiente, los programas de mejoramiento genético para la tolerancia a sequía, tanto por métodos tradicionales como biotecnológicos, han tenido en general un alcance limitado. Los cultivares de soja con rasgos de tolerancia a estrés ambiental son escasos y la base genética con que cuentan los programas de mejoramiento genético de este cultivo, es estrecha (Hufstetler *et al.*, 2007), dificultando aún más la obtención de cultivares resistentes a sequía. En este contexto, resulta indispensable el empleo de estrategias que permitan ampliar esa variabilidad o posibiliten la mejora por incorporación dirigida de genes de interés y poder aprovechar este conocimiento para generar cultivares elite con un alto potencial de rendimiento bajo condiciones de estrés.

Entre las características asociadas a la resistencia al déficit hídrico en soja se destacan aquellas que están relacionadas con la raíz (Abdel-Haleem *et al.* 2011), con la capacidad de fijar nitrógeno en estrés (Sinclair y Serraj, 1995), así como con caracteres asociados a tolerancia en partes aéreas, incluyendo i) conductancia estomática, ii) conductancia epidérmica, (Hufstetler *et al.* 2007); iii) eficiencia en el uso del agua (Liu *et al.* 2005) y iv) control de la turgencia celular a través de mecanismos de ajuste osmótico (James *et al.* 2008). Además, se han descrito otros parámetros relacionados con tolerancia a sequía en soja, como la capacidad de limitar en base al fenotipo. El desarrollo de marcadores moleculares asociados a QTL (Quantitative Trait Loci) para tolerancia a sequía ha facilitado la selección en base al genotipo (Carter *et al.* 2003), pero estas regiones explican menos del 10 % de la variación fenotípica observada entre genotipos (Manavalan *et al.* 2009). Esto significa que ninguno de los parámetros fenotípicos evaluados es suficiente por sí mismo para seleccionar genotipos tolerantes. En este contexto, resulta indispensable el empleo de estrategias que integren distintas aproximaciones para generar cultivares elites de alto rendimiento bajo condiciones de estrés.

El mejoramiento genético de las especies ha tenido un desarrollo exponencial durante los últimos 60 años con el surgimiento de nuevas ramas de la genética como la biotecnología y la ingeniería genética. En particular la biotecnología ha sido fuertemente impulsada durante la era genómica, en donde se ha obtenido un importante conocimiento sobre el genoma de distintos organismos. Ya desde el descubrimiento de que los genes eran los elementos determinantes de las características cualitativas y cuantitativas de las especies, los programas de mejoramiento genético de los cultivos se han nutrido de estos conocimientos y han empleado tecnologías que han permitido la manipulación de los genes para generar alelos nuevos. A partir de la segunda mitad del siglo XX, el mejoramiento genético tradicional ha empleado la mutagénesis química (principalmente con etil metano sulfonato) o física (por radiaciones), para generar poblaciones mutantes que luego son analizadas para identificar caracteres de interés en la progenie de estos organismos. Asimismo, el mejoramiento genético tradicional incluye otras técnicas de manipulación genética como el mejoramiento por traslocación y las cruces inter específicas o intergénero (Hartung y Schiemann, 2014).

Las técnicas de mutagénesis han sido cruciales para la generación de variación genética que puede ser explotable en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones son de carácter recesivo, y si bien es posible obtener cultivos homocigotas para las mutaciones de interés, para ello es necesario que la planta pueda ser propagada sexualmente. En el caso de los cultivos de propagación vegetativa, las mutaciones generadas por técnicas de mutagénesis convencional generalmente carecen de utilidad (Singh *et al.*, 2015).

Todas las tecnologías tradicionales tienen en común el carácter altamente inespecífico de las alteraciones genéticas generadas, ya sea porque ocasionan la transferencia de una gran porción del genoma desde una especie a otra, o porque resultan en la mutación de miles de nucleótidos simultáneamente.

En este contexto, la transgénesis ha complementado el repertorio clásico de las técnicas para el mejoramiento genético, así como para la investigación en el campo de la biología vegetal, permitiendo incorporar características nuevas al genoma. Esta tecnología ha permitido independizarse de la barrera natural impuesta por la incompatibilidad de cruzamientos, y en consecuencia, ha aumentado en forma casi ilimitada la disponibilidad de genes.

La transgénesis se refiere a la modificación genética de un organismo, mediante la introducción de uno o más genes provenientes de cualquier otro organismo donante que no es sexualmente compatible con el organismo receptor (Schouten *et al.*, 2006). En el caso de las plantas, pocos son los cultivos transgénicos que han alcanzado la etapa de comercialización. La primera generación de cultivos transgénicos comercializados incluyó cultivos como la soja, el maíz, el algodón y la canola. Las características introducidas en estas especies fueron principalmente la tolerancia a herbicidas y a larvas de insectos. Sin embargo, actualmente existen numerosos ejemplos de varios eventos transgénicos en desarrollo que presentan mejoras relacionadas con el valor nutricional del cultivo y con nuevas características productivas, como la tolerancia al déficit hídrico o el aumento de la eficiencia en el uso del nitrógeno (James 2011, Holme *et al.* 2013).

A pesar de los más de 2000 estudios que apoyan la seguridad de los cultivos transgénicos, (European

Academies Science Advisory Council, 2013; Committee on Genetically Engineered Crops, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2016; Hartung y Schiemann, 2014), existe un escepticismo por parte del público en general sobre el consumo de alimentos transgénicos, lo cual repercute en los productores y en la industria. En este contexto, algunos países han mantenido una política principalmente de oposición al cultivo y al consumo de alimentos transgénicos (Devos *et al.*, 2012). Existen diferentes estudios que muestran que una de las principales preocupaciones del público sobre el uso de cultivos transgénicos, es que éstos presentan una combinación artificial de elementos genéticos derivados de organismos que naturalmente no se pueden cruzar (Bauer y Gaskéell, 2002; Gaskell y Bauer, 2001; Lassen *et al.*, 2002). Esta reserva está vinculada a una percepción de riesgo para la salud y para el ambiente, así como a una noción de respeto por la naturaleza. Con el objetivo de atender estas preocupaciones se han introducido los conceptos de intragénicos y cisgénicos, los cuales se refieren a los organismos que incorporaron genes de especies sexualmente compatibles o estrechamente relacionadas, y que no contienen secuencias de ADN ajenas a la especie. El conjunto de genes y secuencias utilizados en la intragénesis/cisgénesis son, en consecuencia, idénticas a los disponibles para el mejoramiento tradicional.

En particular, la cisgénesis se refiere a la introducción una o más copias adicionales de un gen proveniente de la misma especie, cuya expresión se encuentra bajo el control de sus propias secuencias reguladoras. En el caso de la intragénesis, las secuencias o genes introducidos pueden estar bajo el control de secuencias reguladoras presentes en otros genes, siempre y cuando sean de la misma especie. En ambos casos, el riesgo de transferencia de los elementos genéticos modificados se limitan a los que ya están presentes en el pool genético de las especies compatibles sexualmente y, por lo tanto, es esperable que no generen inquietudes más allá de las que ocasionan sus contrapartes obtenidas por mejoramiento clásico (Nielsen, 2003).

La percepción pública ha demostrado ser esencial para la aprobación de cultivos genéticamente modificados, en particular en Europa. Varias encuestas y entrevistas realizadas en los Estados Unidos y Europa mostraron claramente que tanto los cultivos intragénicos como los cisgénicos son

aceptables para un mayor número de personas que los cultivos transgénicos. Entre un 52%-81% de los encuestados consumiría alimentos genéticamente modificados con genes propios de la planta o procedentes de especies relacionadas, mientras que el 14%-33% consumiría alimentos genéticamente modificados con genes de especies no relacionadas (Gaskell *et al.*, 2011; Lusk y Rozan, 2006; Lusk y Sullivan, 2002; Schaart, 2004). Una encuesta realizada en los EE. UU, incluso mostró que los consumidores están dispuestos a pagar más por intragénicos vegetales con un valor nutricional mejorado (Colson y Huffman, 2011).

Actualmente, el costo de desregulación de un nuevo intragenico/cisgenico para su uso a nivel comercial es igualmente alto que el que se espera para un transgénico que ha incorporado genes foráneos a su genoma. Sin embargo, se ha establecido un debate en torno a lo que atañe a la regulación de los intragenicos/cisgénicos en el cual existe una tendencia a una regularización menos estricta para este tipo de organismos modificados genéticamente (Reporte del panel FSA 2012).

Desde el comienzo en el uso de la transgénesis para la modificación genética de plantas y animales, ha existido un gran interés a nivel de la comunidad científica internacional en el desarrollo de procedimientos que permitan efectuar cambios dirigidos en el genoma. En la última década se han desarrollado un conjunto de tecnologías, colectivamente llamadas de edición genómica, que permiten modificar una región definida del genoma. Esto se logra mediante la introducción de cortes específicos en la doble cadena de ADN lo cual induce los mecanismos de reparación del ADN, generando cambios en la secuencia afectada (Puchta y Fauser 2013).

Una de las ventajas de la edición genómica frente a las técnicas convencionales de mutagénesis o de transgénesis convencional, es que las mutaciones generadas mediante esta tecnología son muchas veces indistinguibles de la variación genética que ocurre naturalmente dentro de una especie. A su vez, esta tecnología permite la obtención de mutaciones homocigotas ya desde las primeras etapas del procedimiento, facilitando la selección de caracteres recesivos (Feng *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2016).

Varios países, entre los cuales se encuentran EEUU, Argentina, Brasil y Chile, han adoptado la resolución de considerar a los cultivos editados

como variedades convencionales, siempre y cuando se demuestre que no contienen secuencias de ADN de otra especie. Cabe destacar que para generar un individuo editado, en la mayoría de los casos, es necesario utilizar la transgénesis como estrategia para introducir el sistema de edición genética a las células vegetales. En esos casos, es indispensable eliminar el ADN transgénico post transformación. En este contexto, resulta particularmente interesante el desarrollo y optimización de metodologías eficientes para la transformación de soja las cuales permitirán el empleo de estrategias de mejoramiento basadas tanto en la edición del genoma o en la cisgénesis/intragénesis.

## ANTECEDENTES

Este trabajo se centró en desarrollar las capacidades en el país para transformar soja y en generar intragénicos de esta especie que incorporen genes involucrados en la tolerancia a sequía. En el presente estudio se generaron plantas de soja intragénicas, con expresión modulada de dos genes asociados a tolerancia al déficit hídrico, *GmIFiso4G* y *GmSEO*. Estos genes forman parte de un conjunto de genes candidatos con potencial utilidad para incrementar la resistencia al estrés hídrico en soja. Los genes fueron identificados por nuestro grupo de investigación como resultado de la comparación del transcriptoma entre dos genotipos de soja contrastantes en cuanto a respuesta a sequía, los cultivares N7001 y TJ2049. El primero es un cultivar de alto rendimiento, definido como tolerante a la sequía por su fenotipo de “slow wilting” (marchitamiento lento) en condiciones de estrés hídrico (Hufstetler *et al.* 2007), mientras que el segundo se considera susceptible al déficit hídrico.

Los genes *GmIFiso4G* y *GmSEO* tienen un patrón de expresión diferencial entre los genotipos tolerantes y susceptibles, siendo inducidos frente al déficit hídrico únicamente en el genotipo resistente. El primer gen codifica para un factor de iniciación de la traducción de la familia *elFiso4G*, mientras que el segundo gen codifica una proteína residente del floema de leguminosas perteneciente a la familia de las “sieve element occlusion”. Resultados previos de nuestro grupo mostraron que la sobreexpresión de estos genes en plantas modelo (*Arabidopsis* y tabaco), incrementó significativamente la tolerancia de estas plantas a diversas condiciones de estrés

abiótico, incluyendo la deshidratación, la salinidad y las bajas temperaturas.

La validación de genes candidatos mediante la evaluación de plantas que los hayan incorporado mediante transgénesis, resulta de gran utilidad para definir la utilidad de esos genes para los programas de mejora. La generación de intragénicos, es decir, plantas que incorporen por transgénesis genes de la misma especie y que carezcan de secuencias de otras especies, es altamente innovador. El potencial beneficio del uso de estos genes para el desarrollo de marcadores funcionales en el mejoramiento o con fines de transgénesis es importante.

La mejora de la tolerancia al estrés ambiental en plantas es compleja además de no ser prioritaria para las grandes empresas biotecnológicas del sector semillero de soja. Esto significa que la obtención de variedades tolerantes a estrés ambiental deba enmarcarse con recursos a nivel país. El INIA ha reactivado el programa de mejora de soja lo que demuestra el interés en la generación de variedades adaptadas a las condiciones locales. Resulta clave que la comunidad científica nacional cuente con las capacidades para transformar soja, lo cual permitirá incorporar nuevas características a este cultivo mediante tecnologías de ingeniería genética, ya sea clásicas o de precisión, como la edición genómica.

## OBJETIVOS:

El objetivo general del proyecto fue desarrollar las capacidades a nivel nacional para incluir la ingeniería genética en el repertorio de técnicas útiles al mejoramiento genético del cultivo de soja. En particular, el proyecto tuvo como objetivos desarrollar las capacidades en el país para transformar soja y generar intragénicos de esta especie que incorporen genes involucrados en la tolerancia a sequía. Por un lado, se buscó poner a punto protocolos de transformación genética de soja utilizando vectores biológicos (*Agrobacterium tumefaciens*) o bombardeo de partículas (biolística). Por otro lado, el trabajo se centró en la construcción de un sistema de vectores de transformación que permita la expresión de genes bajo el control de secuencias reguladoras propias del genoma de soja. A su vez, se buscó que la utilización de estos vectores permita la eliminación de las secuencias de ADN no deseadas luego de la obtención de las plantas transformadas.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Desarrollar y optimizar protocolos de transformación de soja mediante *Agrobacterium tumefaciens* y biolística.
2. Construir un sistema de vectores para la generación de intragénicos en soja.
3. Obtención de genotipos de soja con expresión modulada de genes asociados a tolerancia a sequía.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Optimización de métodos biológicos y físicos para la transformación de soja

En los procedimientos de transgénesis de plantas, el ADN puede ser introducido a los tejidos vegetales utilizando métodos físicos, como el bombardeo de partículas (Kikkert *et al.* 2005), o mediante el uso de vectores biológicos como *Agrobacterium tumefaciens* (Hwang *et al.* 2017). Ambos sistemas han sido utilizados con éxito para transformar soja, presentando ventajas y desventajas particulares en cada caso. El bombardeo de partículas, o biolística, involucra la utilización de un dispositivo de biolística o “gene gun”, que permite disparar dentro del tejido vegetal millones de partículas de oro o de tungsteno recubiertas con ADN. Luego del bombardeo, el ADN se eluye de las partículas y una porción de éste puede ser incorporado en forma estable en el genoma de la célula transformada. Por su parte, el uso de *Agrobacterium* como vector biológico para introducir ADN a las células vegetales es un procedimiento ampliamente difundido para la transformación de plantas y representa en general el método de elección más frecuente.

En el caso particular de soja, los trabajos publicados sugieren que la mayor eficiencia de transformación se obtiene mediante el uso de biolística como estrategia de introducción del ADN a las células vegetales (Santarem y Finer, 1999; Araga *et al.*, 2000; Droste *et al.* 2002). Este método requiere de la utilización de embriones somáticos como explantes y por lo tanto involucra un período prolongado de cultivo de tejidos para generar los explantes competentes para su transformación. Por su parte, los métodos basados en el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, si bien en el caso de soja han mostrado menor eficiencia que la biolística,

presentan algunas ventajas sobre la última (Zhang *et al.*, 1999; Liu *et al.* 2004; Paz *et al.* 2005). En primer lugar, los protocolos desarrollados en soja para transformación mediante biolística requieren de la utilización de genotipos de plantas capaces de generar embriones somáticos. Esta característica no es necesaria para la transformación mediada por *Agrobacterium*, pero en este último caso, los genotipos deben ser susceptibles a la infección por este patógeno. En segundo lugar, el patrón de integración de los transgenes al genoma en general es más simple cuando se utiliza *Agrobacterium*, lo cual resulta en un menor número de copias del transgen en la planta transformada, que cuando se utiliza biolística. Esta característica es una de las principales razones por las cuales la elección del método de transformación suele inclinarse para el uso de *Agrobacterium*. No obstante, la eficiencia de ambos tipos de metodologías suele ser muy dependiente de la especie vegetal e incluso del genotipo de la planta. En base a estos antecedentes, en este trabajo se ensayaron ambas metodologías, biolística y transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

#### 1.1 Transformación de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para generar plantas de soja transformadas genéticamente mediante el uso de *Agrobacterium*, los genes a transferirse a la planta deben ser clonados en vectores binarios. Estos vectores son posteriormente introducidos en una cepa de *Agrobacterium* de forma tal que la bacteria transfiera el ADN a una célula vegetal y que eventualmente este fragmento de ADN sea integrado en el genoma nuclear (Tzfira y Cytosky, 2000). En este proceso de transformación existen varias etapas que son críticas, y dependen tanto del genotipo de la planta como el de la bacteria (Zia *et al.* 2010, Hobbs *et al.* 1989, Yukawa *et al.* 2008).

El primer evento de transformación de soja mediada por *Agrobacterium* fue obtenido en 1988 y publicado por Hinchee *et al.* (1988). Desde entonces se han reportado un gran número de protocolos que modifican y mejoran diversas condiciones que afectan este proceso. Sin embargo, a pesar del progreso en este campo, los niveles de eficiencia obtenidos son limitados y requieren de mayor optimización. A su vez, la mayoría de los protocolos descritos a la fecha están limitados al uso de algunos genotipos, como cultivar Williams 82 y el cultivar Thorne. Estos cultivares muestran una eficiencia relativamente elevada de transformación

por presentar un grado alto de susceptibilidad a *Agrobacterium* (Jia *et al.* 2015). Sin embargo, estos genotipos son pobres en cuanto a caracteres agronómicos, por lo que resulta indispensable optimizar esta tecnología para ser utilizada en cultivos valiosos comercialmente.

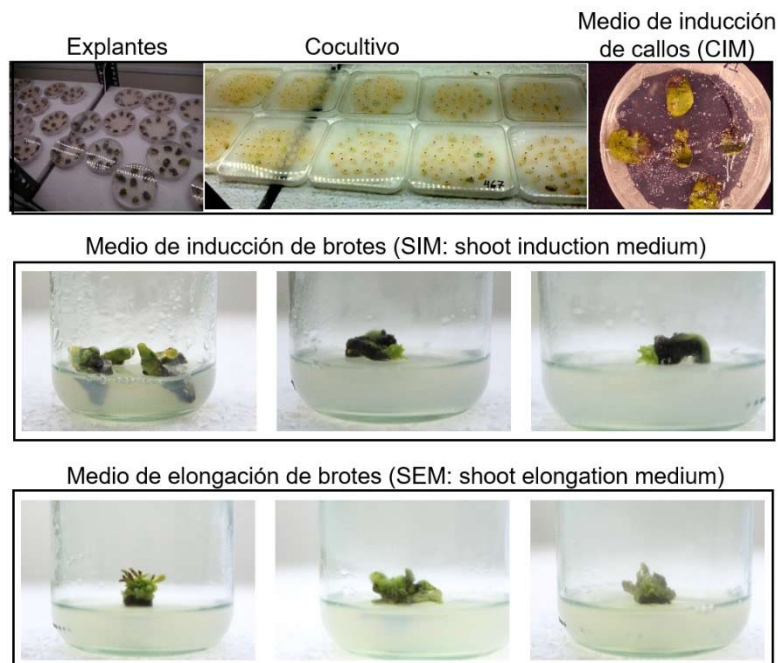
Con el objetivo de establecer y optimizar un protocolo de transformación de soja en base a la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* como método de transferencia de ADN, se evaluaron varios genotipos de soja en cuanto a su capacidad de producción de callos, regeneración de los mismos, y susceptibilidad a una cepa de *Agrobacterium*. Los genotipos utilizados fueron los siguientes:

- Cultivar Thorne, grupo de madurez III (McBlain *et al.* 1993).
- Cultivar Williams 82, grupo de madurez III (Winkler *et al.* 1985).
- Línea LE-35-6, grupo de madurez VI (Programa de mejoramiento de soja de INIA La Estanzuela).
- Línea LE-22-4, grupo de madurez VI (Programa de mejoramiento de soja de INIA La Estanzuela).

Se ensayaron dos metodologías de transformación. La primera estrategia se basó en la transformación de nudos cotiledonares de semillas maduras utilizando el protocolo desarrollado por Paz *et al.*, (2006). En este protocolo, se parte de cotiledones de semillas maduras, a los cuales se les remueve físicamente todo el eje embrionario.

Se realizaron 6 intentos de transformación con 300 explantes cada uno. Se utilizó una construcción génica que contiene el gen *GmSEO* bajo el control del promotor constitutivo p35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV), así como el gen de resistencia a fosfinotricina (glufosinato de amonio). En estos ensayos, se incluyó el genotipo Thorne, por ser el de referencia para las técnicas de transformación mediada por *Agrobacterium*, y se incluyeron dos genotipos correspondientes a líneas del programa de mejoramiento genético de soja de INIA La Estanzuela.

Con esta estrategia se obtuvieron resultados positivos con el cultivar Thorne (Figura 1), pero no con los otros genotipos evaluados. En el caso de estos últimos, se observó un pobre desarrollo de callos, y aquellos callos obtenidos, desarrollaron síntomas de amarronamiento o necrosis.



**Figura 1.** Etapas de la transformación de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens* según Paz *et al.* (2006).

Transformación de nudos cotiledonares de acuerdo al protocolo de Paz *et al.* (2006). Las imágenes muestran el cultivar Thorne transformado con la construcción p35S-GmSEO. Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* HA105 y como agente de selección de los tejidos transformados, fosfinotricina (5 mg/L).

**Tabla 1.** Eficiencia de transformación utilizando protocolo de Paz et al (2006).

Genotipo	Callos (%)	Brotos (%)	Brotos elongados (%)	Plántulas con raíz (%)
Thorne	10	4-5	0,5	0
LE-35-6	1	0	0	0
LE-22-4	1	0	0	0

Los porcentajes se calcularon en base al número de eventos resistentes a fosfotricina sobre un total de 300 explantes ensayados.

En el caso del cultivar Thorne, se logró obtener callos y brotes resistentes a la fosfotricina, con una eficiencia similar a la reportada en la literatura (Tabla 1). Sin embargo, en ningún ensayo se observó elongación de los brotes ni el enraizamiento de los mismos. A su vez, debido al largo período de incubación en medio de elongación, se tuvieron problemas con la oxidación del medio de cultivo, así como contaminación del material vegetal con *Agrobacterium*.

Los resultados obtenidos utilizando el protocolo de Paz et al. (2006) mostraron que la etapa limitante para la transformación, en el caso de los genotipos correspondientes a las líneas de mejoramiento de INIA, fue el proceso de infección con *Agrobacterium* y la inducción de callos.

Los síntomas de amarramiento de los explantes ocurren frecuentemente como resultado de la respuesta de defensa de la planta frente a este fitopatógeno, sugiriendo que estos genotipos son poco susceptibles a la cepa de *Agrobacterium* utilizada. Para atender este problema, se ensayó el agregado de agentes antioxidantes al medio de cultivo, como ascorbato o nitrato de plata. No obstante estos compuestos no mejoraron la sintomatología de los callos obtenidos.

Por su parte, los resultados generados con el cultivar Thorne fueron más alentadores, lográndose obtener callos y brotes resistentes al medio de selección. Sin embargo, el protocolo utilizado presentó problemas en las etapas de regeneración de las plantas, específicamente en la fase de elongación de los brotes. Esto coincide con lo reportado en la literatura, que señala esta etapa de la transformación como uno de los cuellos de botella más importantes para la transformación genética de soja (Li et al. 2017).

En base a los resultados obtenidos, se ensayó otro protocolo de transformación de soja, reportado recientemente por Li et al. (2017). Este protocolo se apoya en el trabajo anteriormente publicado por Paz et al. (2006), pero introduce algunas modificaciones

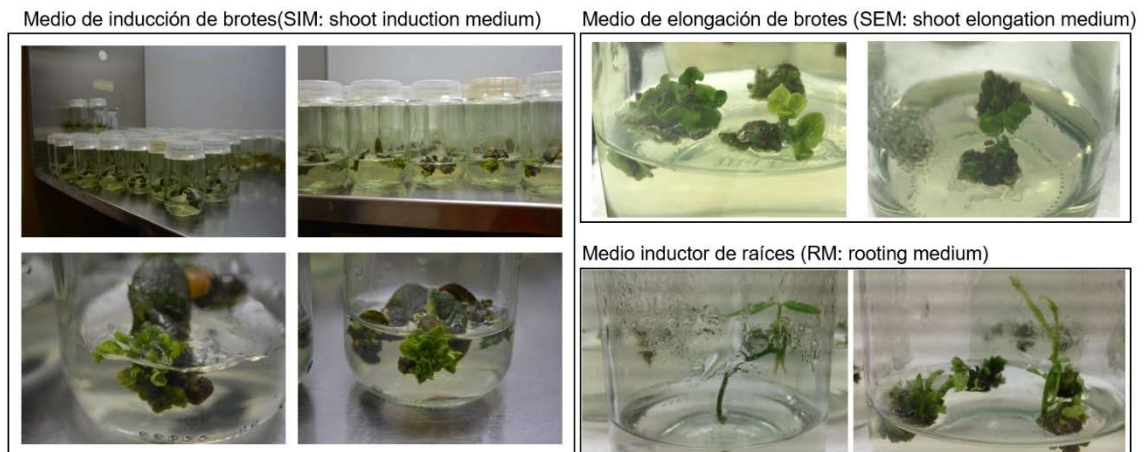
importantes y logra un incremento significativo de la eficiencia de transformación de soja mediada por *Agrobacterium*. Las variantes que se describen en este nuevo protocolo apuntan a optimizar cuatro etapas del proceso de transformación: i) la concentración de *Agrobacterium*, ii) el tipo de explantes utilizados, iii) el medio de suspensión de *Agrobacterium* y iv) el tiempo de cocultivo con los explantes vegetales.

Las modificaciones introducidas con respecto al protocolo de Paz et al. (2006) son varias. En primer lugar, al igual que en el protocolo anterior, este protocolo utiliza como explantes, semillas maduras, abiertas a la mitad. No obstante, en Li et al. (2017), estas mitades de semillas se procesan diferente, en vez de remover completamente el eje embrionario como se propone en la metodología anterior, en este trabajo se sugiere cortar las semillas por el hilum y remover el hipocótilo a una longitud de 3 mm. A su vez, otra de las modificaciones importantes al protocolo consiste en la modificación de la composición del medio de cultivo que se utiliza en la fase de elongación de los brotes (SEM: shoot elongation médium), mediante el agregado de nuevos componentes y la modificación de la concentración y relación de hormonas.

Este protocolo se ensayó con los cultivares Williams 82 y Thorne, por ser los genotipos de referencia para la transformación de soja mediada por *Agrobacterium*. Aquí se presentan los resultados obtenidos con Williams 82, dado que no se contó con una buena calidad de semillas de los otros genotipos. Utilizando esta metodología, se obtuvo una eficiencia de transformación significativamente mayor a la observada con el protocolo de Paz et al. (2006), llegando a obtener plantas regeneradas luego de transcurrir todas las etapas de selección (Figura 2, Tabla 2).

Utilizando este protocolo se alcanzaron niveles de eficiencia de transformación de soja similares a los reportados en la literatura, los cuales se ubican en el orden de un 5 % de los explantes utilizados





**Figura 2.** Etapas de la transformación de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens* según Li et al (2017).

Transformación de nudos cotiledonares de acuerdo al protocolo de Li et al (2017). Las imágenes muestran el cultivar Williams 82 transformado con la construcción p35S-GmSEO. Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* HA105 y como agente de selección de los tejidos transformados, fosfinotricina (5 mg/L).

**Tabla 2.** Eficiencia de transformación utilizando protocolo de Li et al (2017).

Genotipo	Callos (%)	Brotos (%)	Brotos elongados (%)	Plántulas con raíz (%)
Williams 82	80	42	5	3

Los porcentajes se calcularon en base al número de eventos resistentes a fosfinotricina sobre un total de 120 explantes ensayados.

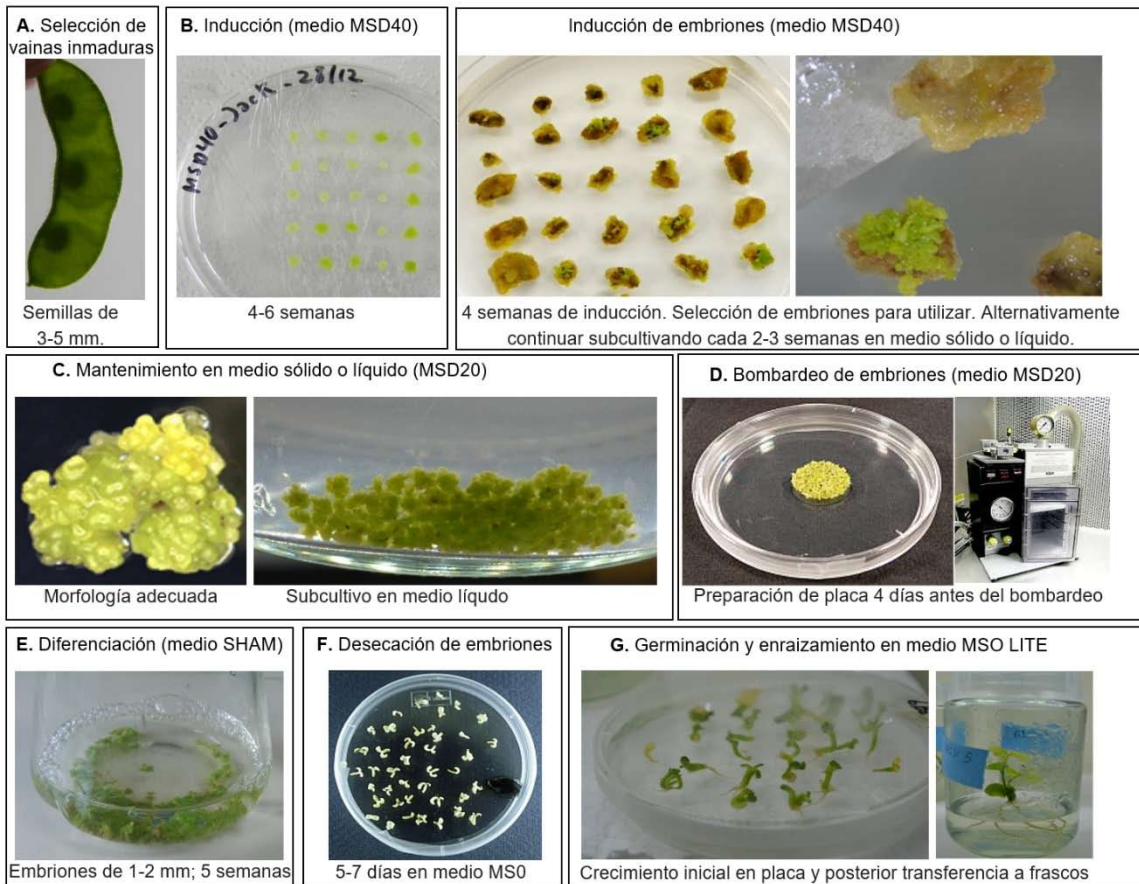
como material de partida. Los datos de eficiencia específicos para cada etapa del procedimiento se muestran en la Tabla 2, y los detalles del protocolo y la composición de los medios de cultivos se presentan en el Anexo 1.

### 1.2 Transformación de soja por bombardeo de partículas.

El bombardeo de partículas recubiertas de ADN (biolística) es un método eficiente para la producción de plantas transgénicas. La principal ventaja de este procedimiento frente a otros métodos de transformación es que se independiza de los aspectos relacionados con la susceptibilidad a *Agrobacterium* como agente biológico de transferencia del ADN. La factibilidad de este método para producir plantas capaces de transmitir el ADN introducido a su progenie, depende de identificar y acertar en las células que darán lugar al tejido de la línea germinal. En muchos casos, se utilizan como tejido blanco, embriones somáticos desarrollados a partir de determinados tipos de explantes vegetales. En el caso de soja, los protocolos más eficientes de transformación y regeneración son los que utilizan cotiledones de semillas inmaduras para inducir la embriogénesis somática.

Durante el transcurso de este proyecto se puso a punto un método de biolística para la transformación de soja. Para ello, se adoptó un protocolo desarrollado por el grupo del Dr. Parrott de la Universidad de Georgia, EEUU, el cual fue adaptado a partir de otros trabajos previos de ese y otros grupos (Buchheim *et al.*, 1989; Finer, 1988; Finer y Nagasawa, 1988; Samoylov *et al.* 1998; Wright *et al.*, 1991). El procedimiento consta de varias etapas principales: i) Inducción de embriones somáticos, ii) bombardeo de partículas recubiertas de ADN, iii) Selección de embriones transformados, iv) Diferenciación y v) Germinación.

La etapa limitante más importante en este procedimiento consiste en la inducción de embriones somáticos. La mayoría de los reportes de transformación de soja por biolística utilizan el cultivar Jack (Nickell *et al.* 1990) como material de partida. Este genotipo tiene un ciclo de maduración muy corto (GM 2) y una alta capacidad embriogénica, debido a lo cual es el genotipo de referencia para esta tecnología. Si bien el cultivar Jack no presenta mayores caracteres de interés agronómico importantes, se optó por poner a punto la tecnología de biolística utilizando este genotipo, para luego intentar identificar otros genotipos con capacidad embriogénica.



**Figura 3.** Etapas de la transformación de soja mediada por Biolística

Etapas de transformación del cultivar Jack mediante biolística. Morfología de una vaina apta para selección de semillas inmaduras (A); Cotiledones de semillas inmaduras en medio de inducción de embriones somáticos (B); Morfología de embriones somáticos adecuada para transformación genética (C); Disposición de embriones somáticos en una placa de Petri previo al bombardeo de partículas (D); Diferenciación y selección de embriones transformados (E); Deshidratación de embriones transformados (F); Germinación y enraizamiento de plántulas transformadas.

### 1.2.1 Puesta a punto del protocolo con un genotipo de referencia.

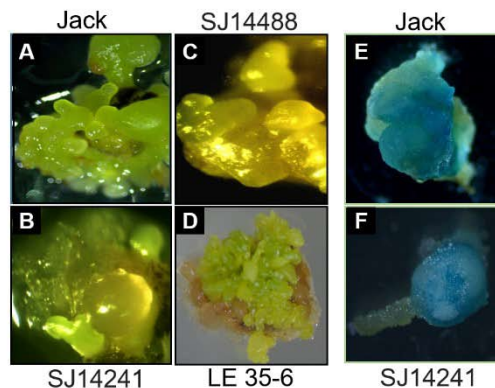
Para poner a punto esta metodología, se utilizaron tres construcciones génicas diferentes. Todas las construcciones permiten la expresión constitutiva de los genes candidatos a partir del promotor de ubiquitina, y confieren resistencia a higromicina por presentar el gen *hph* (*hygromycin B phosphotransferase*) de *Escherichia coli*. Los genes utilizados para expresión en soja fueron *GmSEO*, *GmeIFiso4G* y el gen reportero GUS-GFP. Los embriones fueron bombardeados con partículas de oro de 1 micra de diámetro, recubiertas con ADN circular, utilizando el procedimiento detallado en el Anexo II. Las distintas etapas del proceso de inducción de embriones somáticos, bombardeo y obtención de plántulas transformadas se muestran en la Figura 3.

Utilizando el protocolo descrito en el Anexo 2, se obtuvo una frecuencia de transformación de aproximadamente 5-6 % de los embriones bombardeados. Esta frecuencia es similar a la reportada en la literatura, y corresponde aproximadamente a 8-10 eventos transformados por disparo de partículas. En conclusión, se logró reproducir todas las etapas de la técnica de biolística aplicada al genotipo de referencia Jack. A su vez, se realizaron modificaciones a otros protocolos existentes que mejoraron la eficiencia de transformación y regeneración de las plantas.

### 1.2.2 Evaluación y selección de genotipos embriogénicos de soja

Si bien el cultivar Jack tiene algunas características genéticas interesantes (resistencia a las razas 3 y 4 de *Heterodera glycines* y un contenido relativamente alto de proteínas en la semilla),

Genotipo	GM	Desarrollo de embriones (%)
LE 22-25-4	6.8	2,8
LE 35-6	6	4,8
SJ14488	5.1	17
SJ14241	6.5	49,3
Jack	2	44,7



**Figura 4.** Capacidad embriogénica y de transformación de distintos genotipos de soja

Izquierda: la tabla muestra los genotipos utilizados, el grupo de maduración (GM) al cual pertenecen, y el porcentaje de embriones somáticos que se obtuvo, partiendo de un total de 120 explantes de cada genotipo. Derecha: Morfología de los embriones somáticos obtenidos para cada genotipo (A-D). Ensayo histoquímico de actividad GUS en embriones transformados del cultivar Jack (E) y de la línea avanzada SJ14241 (F).

sus características de desarrollo no son las más adecuadas para su cultivo en la región.

Con el objetivo de poder transformar por biolística, genotipos útiles al programa de mejoramiento de soja, se evaluaron varias líneas de soja en cuanto a su capacidad de producir embriones somáticos. Se evaluaron varias líneas avanzadas del programa de mejoramiento de INIA-La Estanzuela y se comparó la capacidad embriogénica de estas plantas con la del cultivar Jack. De los genotipos evaluados se identificó una línea avanzada de mejoramiento (SJ14241), que muestra un porcentaje de embriogénesis somática similar al observado para el genotipo de referencia Jack (cerca del 50 %) (Fig. 4).

En base a estos resultados, se procedió a transformar los genotipos embriogénicos (SJ14241 y Jack) con una construcción génica que expresa el gen reportero GUS-GFP bajo el control del promotor de ubiquitina de soja. El gen GUS-GFP codifica una proteína quimérica que consiste en la fusión entre la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (Jefferson *et al.* 1986) y la proteína verde fluorescente (GFP: Green fluorescent protein). La proteína quimérica tiene una actividad doble, por un lado, es capaz de catalizar la degradación del sustrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D glucuronide (X-gluc), para dar una coloración azul mediante un ensayo histoquímico. Este sustrato permite visualizar la actividad de la de la  $\beta$ -glucuronidasa en las células o tejidos transformados en forma simple y fácil. Por otro lado, es posible visualizar la fluorescencia emitida por GFP por microscopía de fluorescencia, utilizando un procedimiento no destructivo.

Los resultados muestran que el genotipo SJ14241 fue transformado con la misma eficiencia que el cultivar Jack (Figura 4E y 4F). Se utilizó el protocolo descrito por Jefferson (1988) para visualizar el producto de la actividad GUS en embriones somáticos transformados.

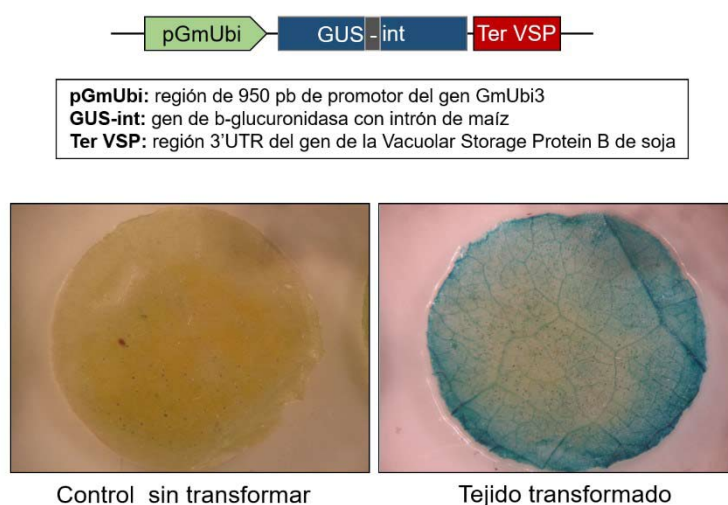
En conclusión, en este trabajo se puso a punto un procedimiento de transformación de soja por biolística, obteniéndose eficiencias de transformación similares a las reportadas en la literatura. Incluso, se logró introducir algunas mejoras al protocolo original, que permiten incorporar nuevos genotipos de soja para ser transformados mediante esta metodología. Esto es importante, ya que una de las limitantes mayores de este método radica en la capacidad embriogénica de los distintos genotipos de soja.

Cabe destacar que con el aporte de otros proyectos, se adquirió el equipamiento necesario para implementar esta técnica en forma rutinaria, lo cual derivó en el desarrollo de una plataforma de transformación genética de soja.

## 2. Construcción de un sistema de vectores de transformación para la generación de intragénicos en soja.

Se construyó un sistema de vectores para la transformación de soja por procedimientos de biolística o mediados por *Agrobacterium*. El sistema tiene dos particularidades: por un lado, permite la eliminación de secuencias no deseadas de las plantas transformadas, utilizando el sistema de recombinación cre/lox. Por otro





**Figura 5.** Expresión de  $\beta$ -glucuronidasa en hojas de *Nicotiana tabacum* transformadas de forma transitoria con *Agrobacterium tumefaciens*

Discos de hojas infiltradas y no infiltradas con *Agrobacterium* conteniendo un vector binario con la construcción génica esquematizada en la figura. Los discos fueron incubados por 3 horas en una solución con el sustrato de la  $\beta$ -glucuronidasa, X-gluc, y procesados para estudiar la expresión de la enzima in situ mediante ensayos histoquímicos

lado, los vectores fueron construidos utilizando secuencias de ADN (promotores y terminador) aisladas del genoma de soja. De ese modo, la regulación de la expresión de los genes candidatos introducidos en soja por transgénesis, estará dada por secuencias provenientes de esta especie. Consecuentemente, se obtendrán plantas intragénicas por carecer de secuencias de ADN de otros organismos. A su vez, los vectores para biolística y para *Agrobacterium* son compatibles, ya que permiten el fácil intercambio de las construcciones génicas entre los vectores.

### 2.1 Selección de promotores para la expresión constitutiva de los genes candidatos.

Para dirigir la expresión de los genes candidatos se buscaron secuencias promotoras de genes que exhiben una expresión fuerte y constitutiva, así como de genes que se activan en respuesta al déficit hídrico.

Estudios anteriores han permitido definir regiones promotoras de genes constitutivos de alta expresión de soja (Chiera *et al.* 2007; Hernández-García *et al.* 2010). En base a los datos revisados en la literatura, se eligió una región de aproximadamente 950 pb corriente arriba de la secuencia codificante

del gen de poliubiquitina de soja *GmUbi3* (Glyma20g27950).

Para evaluar la funcionalidad del promotor *GmUbi*, se amplificó esta secuencia a partir de ADN genómico del cultivar Williams 82, y se clonó en un vector binario, junto con la secuencia terminadora (3' UTR), del gen de la proteína vacuolar de almacenamiento-B (vacuolar storage protein B) de soja. Estas secuencias reguladoras fueron evaluadas utilizando el gen reportero GUS, el cual también fue incorporado en la construcción génica. En este caso en particular, se utilizó una versión del gen GUS que contiene un intrón de maíz, de forma tal de garantizar que la actividad de su proteína se debe a la expresión del gen en las células vegetales y no proviene de su actividad en *Agrobacterium*. El cassette de expresión: pGmUbi-GUS-3'VSPB fue clonado en un vector binario y la construcción génica resultante fue introducida en la cepa HA105 de *Agrobacterium tumefaciens*. La expresión de GUS fue monitoreada en ensayos transitorios en plantas de tabaco, utilizando el método de agroinfiltración de hojas descrito por Voinnet *et al.* (2003) y detección de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa (Figura 4).

Estos resultados permitieron determinar que el promotor *GmUbi* controla correctamente la expresión génica del gen reportero. A su vez, se observó un nivel de expresión fuerte y constitutivo en los tejidos transformados.

## 2.2 Identificación de promotores de genes de soja inducibles por déficit hídrico.

Con el objetivo de contar con un sistema de expresión de genes inducible por estrés hídrico, en este proyecto se buscó identificar promotores de genes de soja que responden al déficit hídrico, en una biblioteca sustractiva previamente generada en nuestro laboratorio (Gallino *et al.*, 2018).

Para ello, se realizaron ensayos de Northern blot, utilizando como sondas la secuencia de cDNA de los genes inducidos por deshidratación. Se extrajo ARN de tres cultivares diferentes de soja (N7001, TJS2049 y Munasqa), los cuales presentan un fenotipo contrastante frente a déficit hídrico. Se tomaron muestras de plantas cultivadas en condiciones óptimas de crecimiento (Control), y plantas sometidas a un déficit hídrico (50% de capacidad hídrica del sustrato). A su vez, se obtuvieron muestras a partir de hojas o raíces de plantas tratadas con diferentes hormonas (ácido abscísico, ácido salicílico) y agentes inductores de estrés oxidativo (paraquat). Finalmente se obtuvo ARN a partir de distintas regiones del grano de soja del genotipo N7001. Diez µg de ARN total de cada muestra fueron separados en geles desnaturalizantes de agarosa y transferidos a membranas de nylon. Las sondas fueron marcadas con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y fueron utilizadas en ensayos de hibridación con las membranas de nylon. Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 6.

En base a los resultados obtenidos, se eligió el gen DHN, el cual se induce fuertemente frente a la deshidratación, tanto en hojas como en raíces. A su vez, presenta cierto grado de inducción frente a tratamientos de estrés oxidativo generado por paraquat (metil viológico).

El gen DHN de soja (*GmDHN*: Glyma09g31740) codifica para una proteína de la familia de las LEA 2 (late embryogenesis abundant), de 27 kDa. Para obtener la región del promotor de este gen, se amplificó y clonó una secuencia de 1500 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción del gen a partir de ADN genómico del cultivar N7001 de soja. Esta secuencia fue introducida en los vectores para transformación de soja generados en este trabajo, para contar con un sistema de expresión de genes candidatos inducible por déficit hídrico.

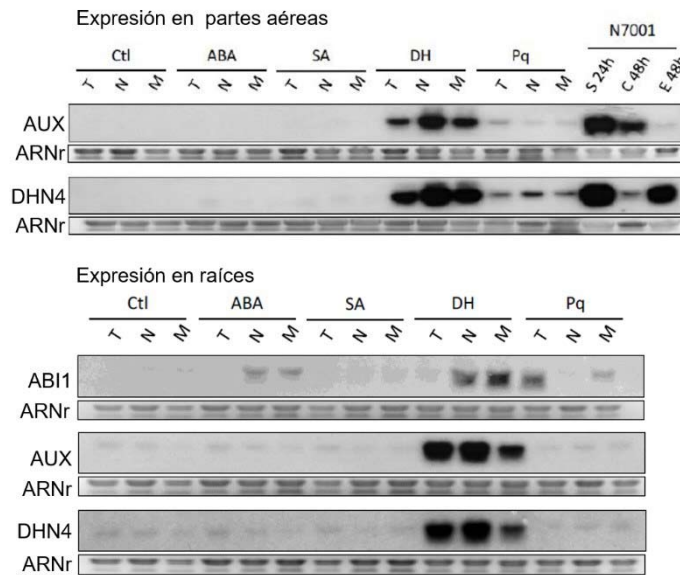
## 2.3 Componentes y ensamblado de vectores para biolística

En el caso de la transformación mediante biolística, es recomendable que el vector tenga un tamaño lo más reducido posible, ya que el método puede resultar en la fragmentación del ADN si la secuencia es muy grande. Tomando en cuenta esta consideración, el vector de biolística fue desarrollado utilizando con base el plásmido pBluescript SK (-); acc. X52324.1. A este vector, se le eliminó, tanto el origen de replicación del fago F1, como la secuencia del promotor T7. Se colocó el sitio de multiclonado a partir del sitio de restricción NaeI de este plásmido. El vector final para biolística se denominó pSBio (Figura 7).

### 2.3.1 Sistema cre/lox para eliminar las secuencias no deseadas del genoma.

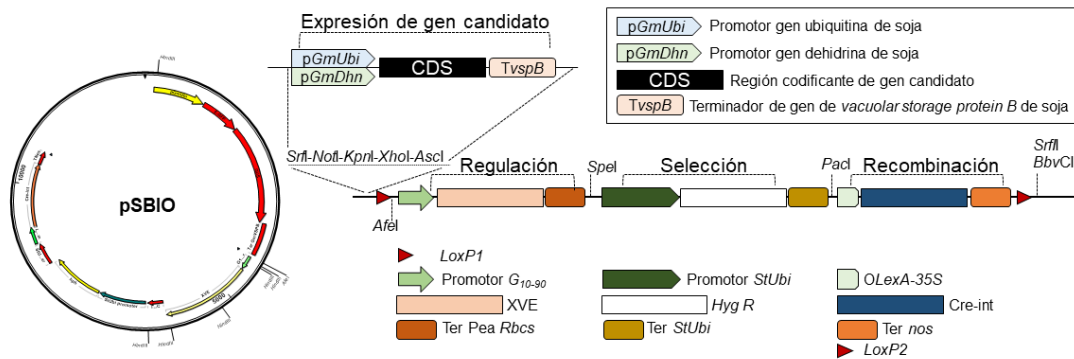
Para eliminar del genoma las secuencias de ADN no deseadas, se generó un vector que utiliza el sistema cre/lox, proveniente del bacteriófago P1 (Sauer and Henderson 1988; Sternberg and Hamilton 1981). Este sistema se basa en dos componentes: (a) la recombinasa cre, que cataliza la recombinación entre dos sitios LoxP, y (b) los sitios LoxP, que consisten en secuencias de 34 pares de bases (pb): 8 pb centrales y 13 pb de repetidos inversos que flanquean la secuencia de 8 pb central, donde ocurre la recombinación. La orientación y la ubicación de los sitios LoxP determinan si la recombinación resulta en una delección, una inversión u otro tipo de rearrreglo genómico (Nagy 2000). Si estos sitios están orientados en la misma dirección en un segmento del cromosoma (arreglo en cis), la cre recombinasa generará la delección del ADN que está entre los dos sitios LoxP.

Utilizando el sistema cre/lox, se construyó un vector de transformación conteniendo el gen de la cre recombinasa bajo el control de un promotor inducible por  $\beta$ -estradiol, un compuesto ausente en el tejido vegetal. De esta forma, es posible mantener un estricto control sobre la expresión de esta proteína y poder regular el momento de escisión del ADN no deseado. El sistema de expresión inducible consistió en la secuencia mínima del promotor sintético G10-90 (Ishige *et al.* 1999), controlando la expresión de la proteína XVE. Esta última es un activador de la transcripción quimérico, constituido por la región que codifica el dominio de unión al ADN del represor bacteriano LexA, el dominio ácido de transactivación de VP16, y la región carboxilo terminal del represor de estrógenos humano. Como región de terminación de la transcripción del gen XVE, se utilizó la secuencia 3'UTR del gen Rbcs3A de poroto. Este módulo



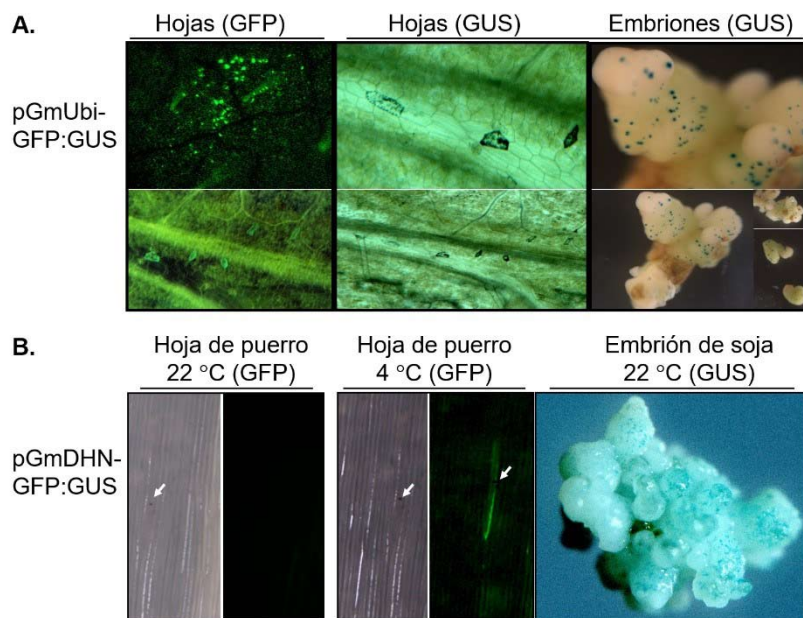
**Figura 6.** Análisis de la expresión de genes en variedades de soja contrastantes.

Ensayos de Northern blot utilizando sondas radiactivas generadas a partir de los siguientes genes: AUX: Respuesta a auxinas; DHN: Dehidrina-27 kDa; ABI1: fosfatasa de respuesta a ácido abscísico. Genotipos: T (TJS2049); N (N7001); M (Munasqa). Tratamientos: 24 h a menos que se indique lo contrario. Ctrl: control; ABA: ácido abscísico 2 uM; SA: ácido salicílico 2 mM; DH: deshidratación 3 días; Pq: 1uM metil viológeno (paraquat). S: semillas; C: cotiledones; E: embriones. Control de carga de ARN en gel de electroforesis: tinción de muestras con bromuro de etidio (ARNr).



**Figura 7.** Representación esquemática de los vectores generados para la transformación de soja por biolística.

LoxP1: sitio de recombinación de la cre recombinasa; XVE: proteína de fusión con dominio receptor de glucocorticoides; Ter Pea Rbcs: región 3'UTR del gen de la subunidad pequeña de la ribulose bifosfato carboxilasa de arveja; Promotor StUbi: Promotor del gen ubiquitina de *Solanum tuberosum*; Hyg R: higromicina fosfotransferasa (*hph*); Ter StUbi: terminador del gen ubiquitina de *Solanum tuberosum*; OLexA-35S: Operador LexA-promotor mínimo CaMV 35S  
*Cre-int*: gen de cre recombinasa con intrón de maíz; Ter nos: Terminador del gen de la nopalina sintetasa; LoxP2: sitio de recombinación de la cre recombinasa.



**Figura 8.** Expresión transitoria en hojas o embriones somáticos de soja transformados por biolística.

A. Expresión transitoria de *GmUbi*-GUS:GFP-TerVSPB en hojas y embriones de soja transformados por biolística. Evaluación de actividad GFP-GUS mediante monitoreo de fluorescencia de GFP o actividad GUS mediante reacción con X-Gluc. Las fotos fueron tomadas 24 h luego del bombardeo. B. Expresión transitoria de *GmDHN*-GUS:GFP-TerVSPB en epidermis de puerro y en embriones de soja transformados por biolística. La fluorescencia emitida por GFP fue evaluada en epidermis de puerro incubados a temperatura ambiente o a 4 °C durante dos días. A la izquierda se muestra en campo claro, a la derecha, la fluorescencia de GFP. La actividad GUS fue evaluada en embriones somáticos de soja (cultivar Jack) mediante ensayos histoquímicos con el sustrato X-Gluc. Las fotografías fueron tomadas 24 h luego del bombardeo.

de expresión fue amplificado por PCR a partir del vector pX6-GFP (Zuo *et al.* 2000), aportado por el Prof. N-H Chua de Rockefeller University.

Un segundo módulo de expresión consistió en el gen *cre-int*, el cual codifica para la cre recombinasa, conteniendo el intrón V del gen KOR1 de *Arabidopsis* (Zuo *et al.* 2001). La presencia del intrón permite asegurar que la producción de la proteína cre ocurra en células vegetales, evitando la producción de esta proteína en las bacterias utilizadas durante el proceso de clonación y transformación. Para regular la expresión de cre, se clonó una secuencia correspondiente al operador LexA (en ocho copias), sucedidas por el promotor mínimo (-46) 35S de CaMV (Zuo *et al.* 2000), y el terminador 3' nos, proveniente del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. Este sistema permite que ante el agregado de  $\beta$ -estradiol, el represor XVE se libere del operador LexA y consecuentemente se induzca la expresión del gen *cre-int*.

### 2.3.2 Módulo de selección de células transformadas.

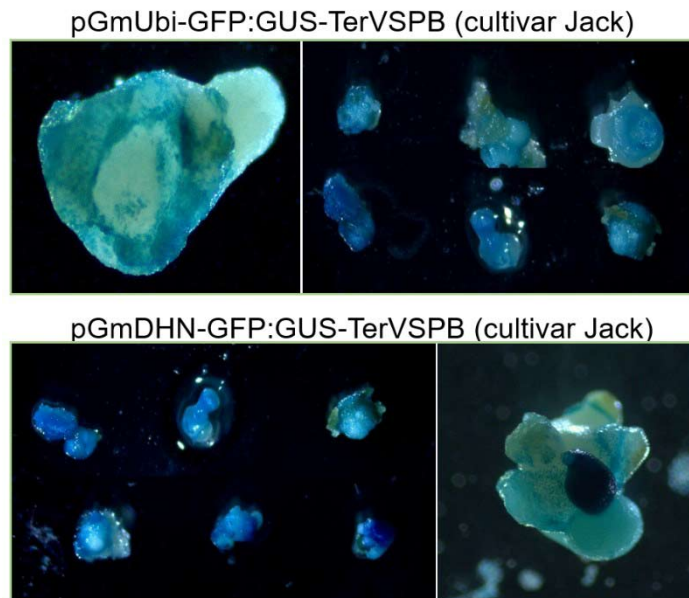
Para facilitar la selección de los eventos transformados, se incorporó al vector un módulo

de expresión conteniendo el promotor del gen de ubiquitina de *Solanum tuberosum StUbi3* (Garbarino y Belknap, 1994), el gen *hph* (*hygromycin B phosphotransferase*) y la región 3'UTR del gen *StUbi3*. La expresión de *hph* confiere a la planta resistencia a higromicina. Este último módulo de expresión fue aislado del vector pUHN4 aportado por el Dr. Parrott de University of Georgia. Se optó por este sistema de selección debido a que la higromicina es un buen agente de selección tanto en embriones somáticos como en callos.

### 2.3.3 Delimitación de la secuencia a escindir post-transformación.

Se clonaron dos sitios LoxP (LoxP1 y LoxP2), flanqueando los dos módulos de expresión de *cre-int* y el módulo de selección. De esa manera, una vez seleccionadas las plantas transgénicas, estas secuencias pueden ser eliminadas del genoma ante el agregado de  $\beta$ -estradiol.

Para facilitar el clonado de los módulos de expresión de los genes candidatos, se introdujo una secuencia con sitios de restricción únicos, en una región inmediatamente corriente arriba del sitio LoxP1. Esto permite el clonado tres o más



**Figura 9.** Transformación estable de embriones de soja con vectores para biolística

Se cortaron pequeñas porciones de embriones somáticos transformados con *pGmUbi*-GFP:GUS (arriba) y *pGmDHN*-GFP:GUS (abajo) para evaluar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa mediante un ensayo histoquímico con el sustrato X-Gluc. Los embriones fueron previamente seleccionados durante 6 semanas en presencia de higromicina antes de ser analizados.

secuencias de ADN, correspondiente a promotor, región codificante y terminador.

Finalmente, para facilitar el aislamiento de la construcción entera, se generaron dos sitios de restricción para la enzima *SrfI*, flanqueando los cuatro módulos de expresión. Esta enzima es de corte poco frecuente y deja extremos romos en el ADN. De esta manera, con una única enzima se puede separar la construcción entera, permitiendo su clonado en un vector binario, o su utilización directa en la transformación vegetal en forma de ADN lineal. El vector resultante se denominó pSBIO y se esquematiza en la Figura 6.

### 2.3.4 Evaluación de vectores.

Con el objetivo de evaluar la actividad de los promotores aislados para controlar la expresión de genes candidatos, se clonó en gen reportero doble GFP:GUS bajo el control del promotor *GmUbi* o del promotor *GmDHN*. De esta manera, la actividad de los promotores puede ser fácilmente monitoreada mediante visualización de la fluorescencia emitida por GFP, o mediante la detección de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa.

Las construcciones resultantes, *pGmUbi*-GFP:GUS o *pGmDHN*-GFP:GUS, fueron introducidas por biolística en células de hojas

de soja o de puerro o en embriones somáticos de soja. Luego de la transformación, los tejidos bombardeados fueron observados en un estereoscopio de fluorescencia (AXIO ZOOM. V16 de Zeiss) para visualizar la señal de GFP o incubados por 3 horas en una solución con el sustrato de la  $\beta$ -glucuronidasa, X-Gluc, y procesados para estudiar la expresión de esta enzima in situ, mediante ensayos histoquímicos (Figura 8). El bombardeo de hojas de soja se realizó de acuerdo al protocolo desarrollado por Dou *et al.* 2008, utilizándose las primeras hojas verdaderas (monofoliadas), obtenidas 9 a 14 días después de la siembra.

Para el bombardeo, se combinaron 9 mg de partículas de tungsteno de 1,1 micras de diámetro (Bio-Rad), con 50  $\mu$ g de ADN plasmídico, en un volumen final de 100  $\mu$ l conteniendo glicerol al 25%. El bombardeo se realizó usando el dispositivo de biolística He / 1000 como sistema de entrega. La distancia desde la pantalla de parada hasta el estante objetivo fue de 12 cm. La distancia entre el disco de ruptura y el macroportador se ajustó a 3/8 de pulgada y fueron utilizados discos de ruptura de 1100 p.s.i.. El vacío de la cámara fue 26 p.s.i. Después del bombardeo, se incubaron las hojas 1-5 días en la oscuridad y la actividad del gen reportero fue monitoreada por fluorescencia o histoquímica.



Los resultados muestran que el promotor *GmUbi* promovió la expresión de GFP:GUS en todos los tejidos ensayados (Figura 8A), mientras que el promotor *GmDHN* lo hizo únicamente en embriones somáticos (Figura 8B). Esto es coherente con los perfiles de expresión génica de estos genes, que indican que *GmUbi* tiene una expresión basal y constitutiva, mientras que *GmDHN*, en condiciones óptimas de crecimiento, sólo se expresa en embriones u otros componentes de la semilla. Por el contrario, este gen se expresa fuertemente en respuesta al estrés hídrico en hojas, siendo este factor de estrés, difícil de reproducir en tejidos transformados en forma transitoria. Para analizar la actividad del promotor *GmDHN* en hojas en respuesta a estrés, se analizó la expresión del gen reportero frente a temperaturas bajas (4 °C), por ser un factor de estrés que frecuentemente puede inducir la expresión de genes de dehidrinas en plantas.

Las hojas bombardeadas mostraron una clara inducción de la señal de GFP, indicando que la secuencia de promotor aislada contiene los elementos necesarios para controlar correctamente la expresión génica frente a condiciones de estrés o en el desarrollo.

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad del mecanismo de escisión de secuencias no deseadas basado en el sistema de recombinación cre/lox, estas construcciones fueron introducidas en embriones de soja, cultivar Jack para generar plantas transgénicas resistentes a higromicina, que expresan establemente el gen GFP:GUS. Con este sistema se espera obtener plantas de la generación T2, sobre las cuales evaluar la correcta escisión las secuencias comprendidas entre los sitios LoxP, ante el agregado de  $\beta$ -estradiol.

En el transcurso de este proyecto se realizaron las primeras etapas de transformación, obteniéndose un número elevado de embriones somáticos transformados con cada una de las construcciones (Figura 9). La actividad del gen reportero fue monitoreada mediante ensayo histoquímico utilizando el sustrato X-Gluc de GUS. Como era de esperarse, ambos promotores indujeron la expresión del transgén en este tejido. Estos embriones están actualmente en la etapa de diferenciación para generar plántulas transformadas de la generación T0.

En suma, se obtuvo un sistema de vectores para biolística que permite la expresión de genes candidatos en forma constitutivo o inducible por déficit hídrico, bajo el control de secuencias reguladoras propias de soja. Este sistema permite también la posterior escisión de las secuencias de ADN que no se desean mantener en la planta luego de la transformación. Utilizando este sistema, es posible obtener plantas intragénicas con expresión modulada de genes candidatos, carentes de secuencias exógenas a esta especie vegetal.

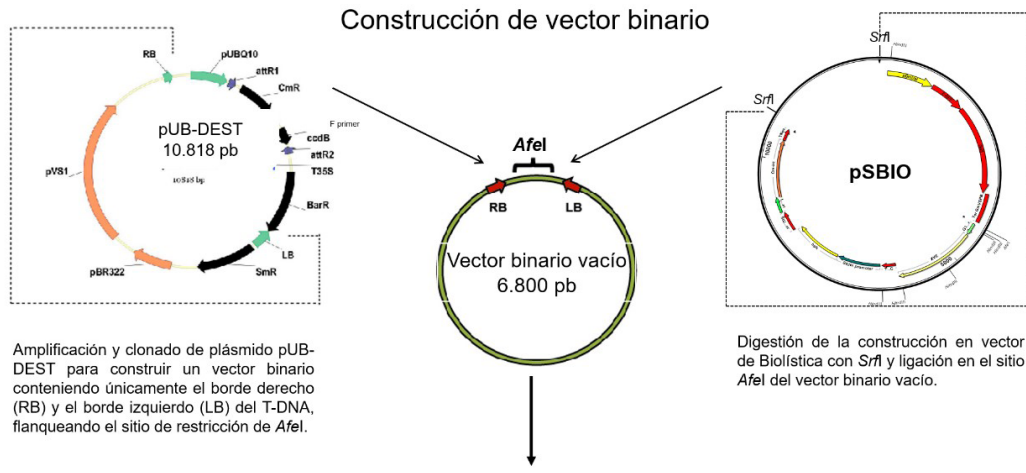
#### **2.4 Generación de vectores para transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.**

Si bien la biolística representa un método eficiente para transformar soja, la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tiene algunas ventajas con respecto a esta técnica, y puede ser el método de elección en algunos casos. La utilización de *Agrobacterium* requiere del clonado de las construcciones génicas en un vector binario, que consiste en un plásmido con un origen de replicación para *Agrobacterium* y uno para *Escherichia coli*. A su vez, es necesario incluir las secuencias correspondientes al borde derecho (RB) y al borde izquierdo (LB) del ADN de transferencia (T-DNA), flanqueando la región de ADN que será transferida a la planta.

En este proyecto se generó un sistema de vectores para transformación mediada por *Agrobacterium* compatible con los vectores para biolística. Para ello, en primer lugar se eliminó toda la secuencia de ADN comprendida entre los bordes derecho e izquierdo del T-DNA del vector pUB-DEST (Grefen *et al.* 2010). En el lugar del T-DNA, se introdujo un sitio de restricción para la enzima Afel. La digestión del vector con esta enzima genera una única molécula de ADN con extremos romos (Figura 10).

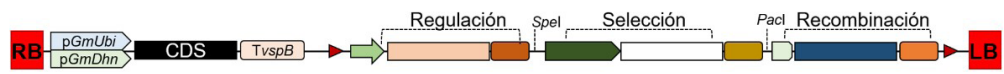
De esta manera, la construcción entera puede ser escindida de pSBio mediante el corte con *SrfI*, y el fragmento correspondiente clonado en el sitio Afel del vector binario.

En suma, se obtuvo un sistema de vectores para biolística y para transformación mediada por *Agrobacterium*, que permite el fácil intercambio de construcciones génicas entre cada tipo de vector. Estos vectores fueron utilizados para clonar un conjunto de genes candidatos para su expresión constitutiva o inducible en soja.



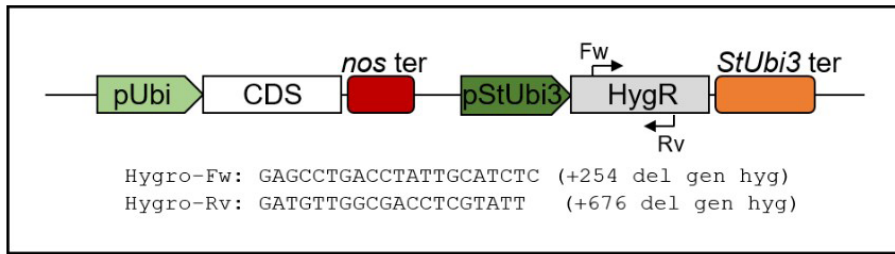
Amplificación y clonado de plásmido pUB-DEST para construir un vector binario conteniendo únicamente el borde derecho (RB) y el borde izquierdo (LB) del T-DNA, flanqueando el sitio de restricción de Afel.

Digestión de la construcción en vector de Biolística con SrfI y ligación en el sitio Afel del vector binario vacío.



**Figura 10.** Representación esquemática de la estrategia seguida para generar los vectores para transformación de soja mediada por *Agrobacterium*.

RB (right border); LB (left border); pGmUbi (promotor de *GmUbi*); pGmDHN (promotor de *GmDHN*); CDC (region codificante de gen candidato); TvspB (terminador del gen VSP-B); Regulación (módulo de expresión de XVE); Selección (módulo de expresión de *hph*); Recombinación: módulo de expresión de cre.



**Figura 11.** Representación esquemática de las construcciones génicas utilizadas para la sobreexpresión de los genes GmeIFiso4G y GmSEO.

pUbi: promotor del gen de Ubiquitina de *Arabidopsis*. CDS: región codificante de GmeIFiso4G o GmSEO. nos ter: terminador del gen de la nopalina sintetasa. pStUbi3: promotor del gen de ubiquitina de *Solanum tuberosum*; HygR: Higromicina fosfotransferasa; StUbi3 ter: terminador del gen de ubiquitina de *Solanum tuberosum*. Las flechas muestran la posición de los cebadores Hygro-Fw (Fw) e Hygro-Rv (Rv), utilizados para amplificar el gen de resistencia a higromicina a partir de plantas transformadas. La secuencia de los cebadores se muestra en la figura.

### 3. Obtención y caracterización genotípica de plantas de soja transformadas con genes asociados a tolerancia a sequía.

En trabajos anteriores de nuestro grupo, se identificaron dos genes (*GmeIFiso4G* y *GmSEO*) que se inducen en condiciones de déficit hídrico en soja, en forma diferencial entre cultivares con fenotipos contrastantes en su respuesta a sequía. Ambos genes alcanzan mayores niveles de inducción en genotipos tolerantes que en los susceptibles. En trabajos previos, los genes fueron clonados y caracterizados funcionalmente a través de su expresión heteróloga en plantas modelo (*Arabidopsis thaliana*). La sobreexpresión

de los genes en *Arabidopsis* incrementó significativamente la tolerancia al estrés hídrico, osmótico y salino en las plantas transgénicas (Gallino *et al.*, 2018).

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de *GmSEO* y de *GmeIFiso4G* en soja, se generaron construcciones génicas conteniendo la región codificante de cada uno de estos genes bajo el control del promotor de Ubiquitina (Figura 11). Las construcciones génicas fueron transformadas en el cultivar Jack mediante biolística y los embriones transformados fueron seleccionados y diferenciados en presencia de higromicina. Las plantas transformadas fueron cultivadas en tierra hasta completar su ciclo.

Se cosecharon semillas de alrededor de 20 plantas diferentes resistentes a la higromicina, de la generación T0. Se sembraron 8 semillas provenientes de cada una de las plantas, y se extrajo ADN genómico a partir de material vegetal proveniente de hojas de plantas de la generación T1.

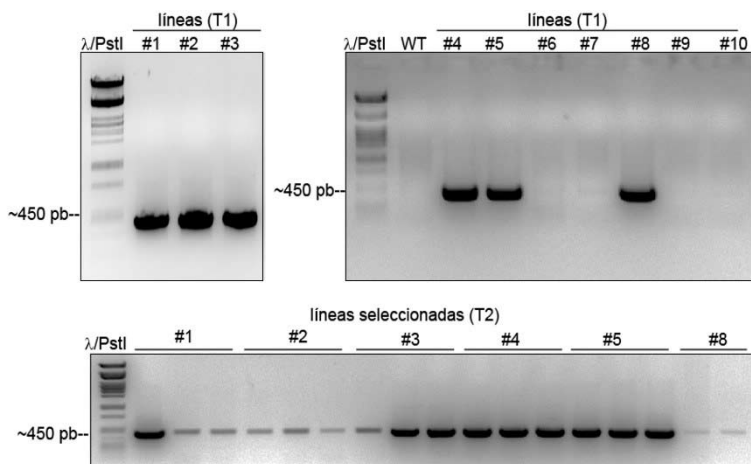
Se identificaron 6 líneas intragénicas T1 para el gen *Gmelfiso4G* y T2 (Figura 12). Asimismo, se identificaron 6 líneas diferentes de la generación T2, conteniendo la construcción para la expresión de *GmSEO* (Figura 13).

Las plantas, correspondientes a distintos eventos de transformación, fueron genotipadas mediante amplificación selectiva del gen de resistencia a higromicina (*HygR*) a partir de ADN genómico. El tamaño esperado del producto de amplificación, utilizando los cebadores descritos en la Fig. 13, es de 450 pb. Se cosecharon semillas de las plantas que mostraron la incorporación de la construcción génica

y se sembraron 4 semillas de cada línea T1 para producir la generación T2. Al menos 3 plantas de cada línea T2 fueron genotipadas nuevamente en cuanto a la presencia del gen de resistencia a higromicina.

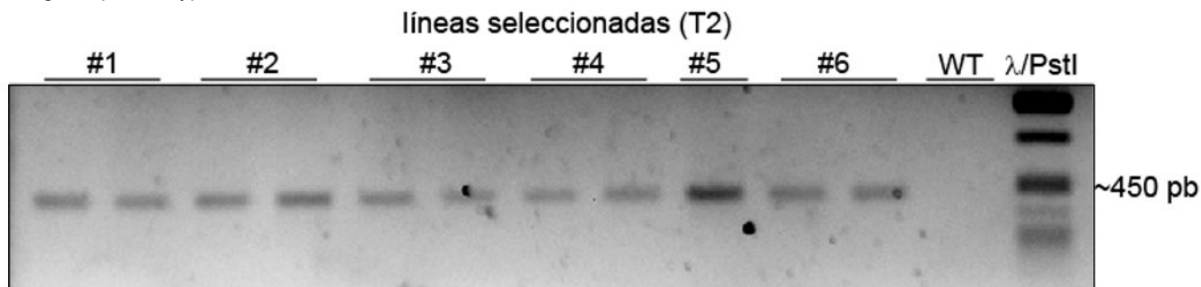
Como resultado de este trabajo, se obtuvieron varias líneas de soja que sobreexpresan los genes candidatos *Gmelfiso4G* y *GmSEO*. Actualmente se están cosechando las semillas de la generación T3 de las líneas transformadas. Resta evaluar el número de inserciones génicas en los distintos eventos de transformación, así como los niveles de expresión de los genes candidatos. Estos ensayos de caracterización molecular, así como de fenotipado, serán realizados sobre plantas provenientes de la generación T3.

Con este trabajo se espera evaluar la sobreexpresión de los genes candidatos seleccionados, como estrategia para producir líneas de soja más tolerantes a la sequía.



**Figura 12.** Genotipado de líneas de soja transformadas con pUbi-Gmelfiso4G.

Separación de productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Se amplificó una región del gen *hph* (resistencia a higromicina) a partir de ADN genómico obtenido de líneas de la generación T1 y T2. Se obtuvo semillas de las líneas seleccionadas en la generación T1, y tres plantas de cada línea T2 fueron genotipadas nuevamente con los mismos cebadores. WT: genotipo wild type, cultivar Jack.



**Figura 13.** Genotipado de líneas de soja transformadas con pUbi-GmSEO

Separación de productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Se amplificó una región del gen de resistencia a higromicina a partir de ADN genómico de plantas correspondientes a 6 líneas de la generación T2. WT: wild type (cultivar Jack no transformado).  $\lambda$ /PstI: Marcador de peso molecular (ADN del fago  $\lambda$  digerido con PstI).

## CONCLUSIONES

En este trabajo se pusieron a punto metodologías para la transformación de soja basadas en métodos físicos (biolística) y en métodos biológicos (*Agrobacterium tumefaciens*). La técnica que mostró mayor eficiencia fue la biolística, mediante la cual se obtuvo un porcentaje de transformación de alrededor de un 5 % del material vegetal de partida. Asimismo, se logró obtener buenos resultados de transformación con dos genotipos de soja, siendo uno de ellos una línea avanzada del programa de mejoramiento genético de INIA-La Estanzuela.

Utilizando biolística se generaron varias líneas de soja intragénicas, con expresión constitutiva de dos genes asociados a tolerancia a sequía. En el transcurso del proyecto, estas líneas fueron caracterizadas molecularmente en cuanto a la presencia de los genes candidatos, seleccionándose las plantas transformadas de la generación T3 para comenzar los análisis fenotípicos. Datos preliminares sugieren que la sobreexpresión de *GmSEO* en soja genera plantas con un sistema radicular más desarrollado. Sin embargo, estas observaciones deberán ser verificadas en futuros ensayos fenotípicos.

Finalmente, se generó un sistema de vectores para la expresión constitutiva o inducible de genes candidatos en soja. Estos vectores tienen la particularidad de contener únicamente secuencias de soja (promotor y terminador) para regular la expresión génica, y de contar con un sistema molecular que permite la escisión de las secuencias no deseadas del genoma, luego de la transformación vegetal.

Por un lado, se generó un vector para expresar constitutivamente los genes candidatos bajo el control del promotor del gen de ubiquitina de soja. Por otro lado, se construyó otro vector que contiene un promotor inducible por déficit hídrico, identificado en el presente estudio. Esta secuencias se aisló mediante el análisis de expresión de varios genes identificados previamente por ser inducibles frente a déficit hídrico en una variedad de soja tolerante a sequía. Se seleccionó el promotor de un gen que codifica una proteína de la familia de las dehidrasas para dirigir la expresión de genes de tolerancia a sequía. Este promotor, así como el promotor constitutivo del gen de ubiquitina de soja, fueron validados en ensayos de expresión transitoria y estable en soja. Los vectores generados podrán ser utilizados para transformación por biolística o por *Agrobacterium tumefaciens*.

A estos vectores se les incorporó el sistema cre/lox para facilitar la eliminación de secuencias de ADN no deseadas post transformación. El sistema se basa en la expresión inducible de la recombinasa cre y la escisión de toda la región de ADN que queda comprendida entre dos secuencias LoxP. De esta manera, es posible utilizar un marcador de selección durante todas las etapas de la transformación vegetal y eliminarlo de las plantas transformadas, una vez seleccionadas las líneas que presenten las características deseadas.

Además de ser de gran utilidad para la producción de plantas intragénicas, estos vectores constituyen una herramienta muy valiosa para la implementación de estrategias de ingeniería genética de precisión, como las de edición genómica. Estas técnicas frecuentemente utilizan la transgénesis como forma de introducir el sistema de modificación genética (CRISPR/Cas9) a las células vegetales (Bortesi y Fisher, 2015). La utilización de vectores de ADN para la expresión in vivo del sistema CRISPR/Cas9 tiene varias ventajas técnicas con respecto a otras estrategias. Entre otras, la transgénesis habilita la utilización de marcadores de selección de las células transformadas, lo cual facilita notoriamente el proceso de obtención e identificación de mutantes. Sin embargo, para que el genotipo vegetal editado no sea considerado transgénico, una vez generadas las mutaciones buscadas, es necesario emplear estrategias para eliminar el ADN transgénico. El uso del sistema cre/lox representa una alternativa válida para lograr este propósito. Para ello, los componentes del sistema CRISPR/Cas9 podrán ser clonados en los vectores de transformación entre los sitios LoxP. De esta manera, la inducción de la síntesis de la cre recombinasa resultará en la eliminación de los transgenes una vez generada la mutación específica. Por consiguiente, los vectores generados en este trabajo podrán ser utilizados para realizar modificaciones genéticas de precisión mediante edición genómica.

Las tecnologías de edición genómica han abierto una serie de posibilidades en el campo de agrobiotecnología y es factible que en el futuro cercano, los cultivos editados sustituyan a los transgénicos en el mercado. Este trabajo contribuye al desarrollo de herramientas para la modificación genética de soja, con énfasis en la tolerancia a sequía. Asimismo, los productos generados en este proyecto se aplican también a la implementación de tecnologías modernas enfocadas a la ingeniería genética de precisión, con importantes aplicaciones en el mejoramiento genético de los cultivos.

## ANEXO 1: Protocolo optimizado de transformación de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens* basado en Li et al (2017)

1. Cultivar *Agrobacterium tumefaciens*, cepa EHA105 en 5 mL de YEB con selección, durante 24 h a 28 °C y 250 rpm.
  2. Escalar el cultivo al día siguiente: 200 µL de cultivo en 200 mL de YEB con selección, y dejar crecer hasta OD650 de 0,6.
  3. Colectar el pellet bacteriano por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min.
  4. Resuspender en medio CCM líquido a una OD650 de 0,7.
  5. Incubar el medio con bacterias durante 30 min a 70 rpm y a 22 °C.
  6. Limpiar los poros con un trapo humedecido en EtOH 75 %, preparado con H<sub>2</sub>O MQ estéril. Esterilizar con gas cloro (100 mL NaClO + 3.5 mL HCl) durante al menos 16 h.
  7. Embeber las semillas en H<sub>2</sub>O estéril a 23 °C en oscuridad por 16-18 h.
  8. Remover la cubierta de las semillas. Remover el hipocótilo a una longitud de 3 mm y cortar las semillas longitudinalmente por el hilium.
- Los cotiledones se incuban con *Agrobacterium* durante 30 min en agitación leve.
9. Colocar los cotiledones en papel de filtro estéril sobre medio CCM sólido con el lado interno (plano) hacia abajo.
  10. Cocultivar durante 5 días a 23 °C, con un fotoperíodo de 16h/8h luz/oscuridad.
  11. Luego del cocultivo los explantes se colocan en medio SIM con el lado interno orientado hacia arriba a 45°. Incubar a 23 °C con un fotoperíodo de 16h/8h luz/oscuridad a. Transferir a medio fresco cada dos semanas.
  12. Cuatro semanas luego de la inducción de brotes, los explantes son transferidos a medio SEM.
  13. Pasar a medio SEM fresco cada dos semanas hasta que los brotes alcancen 3 cm de elongación.
  14. Los brotes son transferidos a medio de enraizamiento hasta que las raíces alcancen 2-3 cm.
  15. Las plantas se transfieren a macetas con suelo:vermiculita 1:1.
- Nota: la composición de los medios de cultivo se detalla en la Figura 14.

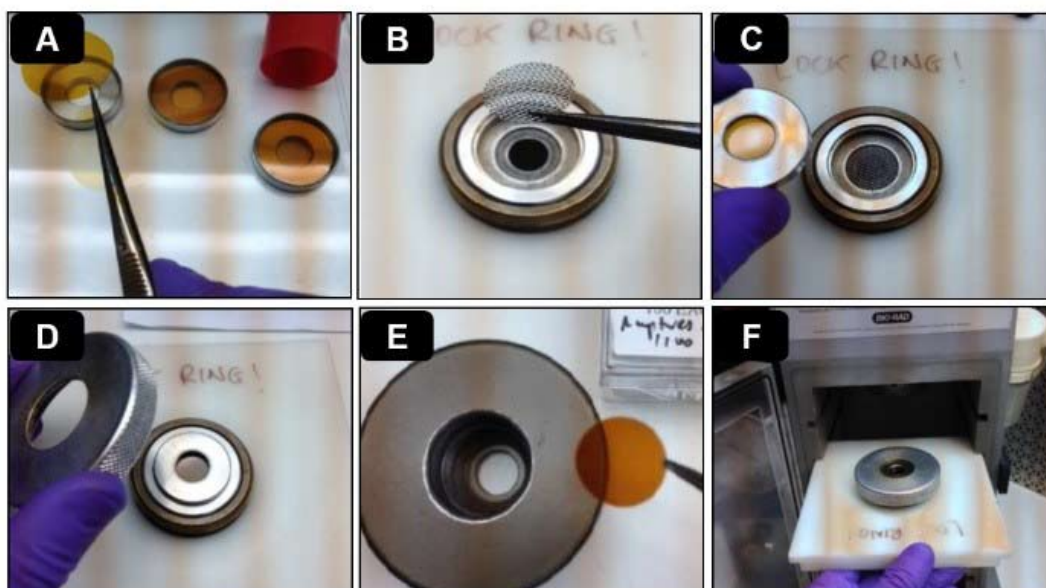


Figura 14. Medios de cultivo para utilizarse en el protocolo de transformación de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

## ANEXO 2: Protocolo optimizado para transformación de soja por Biolística

### I. Preparación de embriones:

1. Se toman embriones seleccionados del cultivo en medio de mantenimiento (MSD20) (Fig. 1C). No utilizar embriones de más de 9 meses de antigüedad. Se disponen de manera uniforme en un área de 30 mm de diámetro (el círculo puede marcarse en el fondo de la placa con el estante como plantilla) en el centro de una placa de MSD20 (Fig. 1D). Se debe evitar incluir tejido oxidado. En caso de observarse oxidación, eliminar las zonas afectadas del tejido antes de confeccionar la placa. La placa debe prepararse 4 días antes de disparar y abrirse en la cámara de flujo 20 minutos antes del bombardeo.
2. Alternativamente, se seleccionan los embriones subcultivados en medio FNL líquido, según se describe arriba y por Finer y Nagasawa (1988) y por modificado por Samoylov *et al.* (1998). En este caso, el día en que el material se va a utilizar para los disparos, se disponen los embriones en un círculo como el mencionado anteriormente y se los deja 20 min con la tapa abierta en el flujo. Luego, se los deja 2-4 h en cámara de flujo laminar con la placa cerrada antes del bombardeo. Fianlmente posterior al bombardeo, se dejan 1-2 h en el flujo con la placa cerrada.
3. Luego del bombardeo, los embriones se separan en 4 placas de medio FNL solido durante una semana y sin la adición de un agente de selección. Pasada la semana se transfieren a matraces conteniendo 35 ml de medio FNL suplementado con 500 mg/L de Timetina y 20 mg/L de Higromicina, realizando cambio de medio semanalmente durante 6-8 semanas. Transcurrido este tiempo se evidencian colonias verdes correspondientes a tejido resistente a higromicina. Se toman dichas colonias y se quita cualquier tejido muerto (Fig. 1E). Posteriormente se coloca las colonias separadas en placas de 6 pocillos conteniendo nuevo medio y se sigue propagando, cambiando el medio cada 2 semanas, hasta tener una cantidad suficiente de embriones para llevar a la etapa de conversión.

### II. Bombardeo: preparación de Microcarriers.

Los insumos para operar el dispositivo de biolística (PDS-1000/He 165-2257), son los siguientes: helio

comprimido (2,500 psi), macrocarriers (Bio-Rad #165-2335), discos de ruptura (e.g. #165-2329), pantallas de detención (# 165-2336).

Microcarriers: oro, 1  $\mu\text{m}$  ((Bio-Rad #165-2263) o 0,6  $\mu\text{m}$  ((Bio-Rad #165-2262); tungsteno ~1.1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Bio-rad #1652267).

Preparar alícuotas de etanol 100%, para que no se hidrate. Mantener totalmente sellados los tubos. Se utilizan partículas de oro de un diámetro de 1  $\mu\text{m}$ . Las partículas de oro se fraccionan y recubren el mismo día en que se realizan los disparos, no guardar.

1. Se colocan 10 mg de polvo de oro (microcarriers) en un tubo eppendorf y se agregan 1 ml de EtOH absoluto.
2. Sonicar en baño sonicador 10 seg. Colocar el tubo en hielo durante 30 segundos. Repetir estos pasos 3 veces.
3. Centrifugar 5 min a 7000 rpm.
4. Retirar el EtOH (no resuspender el pellet de metal).
5. Añadir 175  $\mu\text{l}$  de EtOH absoluto a los 10 mg de polvo de oro.
6. Vortex 1 min : modo Vortex , potencia 3.
7. Se sonica la suspensión de 10 a 15 segundos, dos veces.
8. Para cada disparo de una determinada construcción, se retira una alícuota de 35  $\mu\text{l}$  antes de que los microcarriers se asienten (por cada 10 mg de oro se pueden preparar 5 recubrimientos diferentes)
9. Se transfieren a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml.
10. Antes de retirar cualquier otra alícuota, se agita con vortex y se sónica como se indicó anteriormente.
11. Se centrifugan todas las alícuotas brevemente (aproximadamente 10 segundos) a 10.000 rpm.
12. Se retira el sobrenadante sin levantar el pellet metálico.

El resto del protocolo es para una alícuota (la cual puede utilizarse para 3 disparos):

### III. Bombardeo: recubrimiento de las partículas con ADN

1. Se agregan 1 ml de H<sub>2</sub>O miliQ estéril lentamente y por las paredes del tubo, teniendo cuidado de no resuspender el pellet.
2. Se centrifuga durante 5 min a 2000 rpm. Posteriormente se retira el agua sin resuspender el pellet, si es necesario cambiar de pipeta para remover completamente el sobrenadante.
3. Se agregan 25 µl de solución de ADN (6 ng/µl) al pellet metálico y se resuspenden los microcarriers pipeteando arriba y abajo.
4. Vortex de 2 a 3 segundos.
5. Se sonica de 10 a 15 segundos. Se mantiene el tubo en vortex mientras se avanza con otras alícuotas. Antes de comenzar con el siguiente paso, se sonica el tubo de 10 a 15 segundos.
6. Se agregan 220 µl de H<sub>2</sub>O miliQ estéril.
7. Se resuspende pipeteando arriba y abajo.
8. Vortex de 2 a 3 segundos.
9. Se sonica de 10 a 15 segundos. Se mantiene en vortex mientras se avanza con los demás alícuotas. Antes de comenzar el siguiente paso, sonicar el tubo de 5 a 7 segundos.
10. Se agregan 250 µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M estéril (mantenido en hielo).
11. Se resuspende pipeteando para arriba y para abajo.
12. Vortex de 2 a 3 segundos.
13. Se sonica de 10 a 15 segundos. Se mantiene en el vortex mientras se avanza con los demás alícuotas. Antes de comenzar el siguiente paso, se sónica el tubo de 5 a 7 segundos.
14. Se añaden 50 µl espermidina 0,1 M (helada y de no más de 3 meses de preparación).

15. Se resuspende pipeteando para arriba y para abajo.

16. Vortex de 2 a 3 segundos.

17. Se sónica de 10 a 15 segundos. Se mantiene el tubo en movimiento mientras se avanza con los demás alícuotas.

18. Se coloca el tubo en hielo de 2 a 3 min.

19. Vortex (opcional: en la habitación fría) 10 min, en la potencia 3.

20. Se centrifuga a 500-1000 rpm (velocidad más baja posible) durante 5 min.

21. Se retira el sobrenadante sin dejar que el pellet se seque.

22. Se resuspende el ADN+microcarriers en 600 µl de EtOH absoluto.

23. Vortex de 2 a 3 segundos.

24. Se sónica 7 a 10 seg. Se mantiene el tubo en movimiento mientras avanza con los demás.

25. Se centrifuga 5 min a 500-1000 rpm y se descarta el EtOH sin levantar el pellet. Posteriormente se resuspende el mismo en 36 µl de EtOH al 100%.

26. Se sónica de 5 a 7 seg. Se dejan los tubos en hielo 1 hora.

### IV. Bombardeo de partículas.

Antes de empezar:

1. Se esterilizan los soportes de macrocarriers durante al menos 1 hora en EtOH absoluto. Se dejan en el flujo laminar.

2. Se autoclavan las pantallas de parada.

3. Se esterilizan también los macrocarriers y los discos de ruptura durante al menos 1 hora en EtOH absoluto.

4. Los discos de ruptura están clasificados para varias presiones (400, 600, 800, 1000, 1100 y 1200 psi). Estos discos se pueden usar en pares para lograr la presión deseada. Actualmente estamos utilizando discos de ruptura de 1100 psi.



**Medios de cultivo**

YEB	SIM	SEM
Peptona 10 g/L Extracto de levadura 5 g/L NaCl 5 g/L	Gamborg B5 Sacarosa 30 g/L MES 0,58 g/L Phytigel 3,5 g/L Ajustar a pH 5,6 6-BA 1,67 mg/L Cefotaxime 50 mg/L Carbenicilina 500 mg/L Glufosinate (fosfotricina) 5 mg/L	MS basal Sacarosa 30 g/L MES 0,58 g/L Phytigel 3,5 g/L Ajustar a pH 5,6 GA3 1 mg/L IAA 0,1 mg/L Zeatin 1 mg/L Asparagina 50 mg/L Pyroglutamic acid 100 mg/L Cefotaxime 75 mg/L Carbenicilina 500 mg/L Glufosinate 3 mg/L
CCM	Medio de enraizamiento	
Gamborg B5 1/10 X MES 3,9 g/L Sacarosa 30 g/L pH 5,4 6-BA 1,67 mg/L GA3 0,25 mg/L Acetosiringona 40 mg/L DTT 154,2 mg/L Tiosulfato de sodio 158 mg/L	Gamborg B5 Sacarosa 15 g/L MES 0,59 g/L Ajustar a pH 5.7 Agar 8 g/L IBA 1 mg/L	

**Figura 15.** Preparación de materiales para el dispositivo de biolística.

5. Antes de usar, se dejan secar completamente todas las partes esterilizadas con EtOH (excepto los discos de ruptura), y se limpian todas las piezas del dispositivo de biolística a fondo con 70% de EtOH. Este debe mantenerse siempre en la cámara de flujo laminar.

Las etapas de preparación de los insumos del dispositivo de biolística se ilustran en la Figura 15.

Para cada disparo se debe realizar lo siguiente:

1. Se inserta el macrocarrier en su soporte (Figura 15A).
2. Se resuspende la suspensión DNA con los microcarriers hasta que se disperse. Se sonicán durante 10-15 segundos.
3. Se toman 10 µl de la suspensión y se dispersan uniformemente sobre la superficie del macrocarrier. Se deja evaporar el EtOH completamente. La superficie del macrocarrier debe cubrirse con oro uniformemente. Se ensambla el macrocarrier como se muestra en la Figura 15 (B-E).
4. Se coloca la placa de Petri que contiene la muestra en el centro del soporte y se inserta en

el cuarto estante de la cámara contando desde arriba. Se retira la tapa, se cierra la puerta de la cámara (Figura 15 F)

5. Se ajusta la presión que llega a la pistola a 1300 psi (200 psi por encima de la resistencia del disco de ruptura).
6. Se enciende la bomba de vacío y se oprime el botón en "vacío".
7. Se presiona botón de disparo cuando el vacío alcance 27-28 pulgadas Hg.
8. Cuando la presión de helio excede la resistencia del disco de ruptura, la pistola "dispara".
9. Inmediatamente se suelta el botón de disparo, se cambia el botón a modo ventilación y se apaga la bomba de vacío.
10. Se retira la placa de Petri y se cubre con su tapa.

Los medios de cultivo para inducción, mantenimiento y diferenciación de embriones somáticos de soja se describen en la Figura 16, mientras que las soluciones stock para medios de cultivo de embriones somáticos y plántulas se describen en la Figura 17.



**Medios de cultivo para producción de embriones somáticos**

MSD40	MSD20	FNL: para 1 L
Sales MS Vitaminas B5 Sacarosa 3% 40 mg/l 2,4-D pH 7,0 Gelrite 0,2%	Sales MS Vitaminas B5 Sacarosa 3% 20 mg/l 2,4-D Asparagina 5mM pH 5,8 Gelrite 0,2%	FN-lite macro 100 ml MS micro 1 ml Ca 6.82 ml Fe 10 ml B5 vitaminas 2 ml Asparagina 1 g 2,4D 25 ml Sacarosa 10 g pH 5.80
<b>SHAM: para 1 L</b>		<b>MSO</b>
FNL macro 100 ml MS micro 1 ml Ca 6,82 ml Fe 10 ml B5 vitaminas 2 ml Metionina 0,149 g	Sacarosa 30 g Sorbitol 30 g pH 5,80 llevar a 900 ml Autoclavar  Stock glutamina 110 ml	Sales MS Vitaminas B5 Sucrosa 1,5% pH 5,8 Gelrite 0,2%

Ajustar el pH a todas con NaOH 1M

Figura 16. Composición de medios de cultivo para preparación de embriones somáticos de soja.

**Soluciones stock para producción de embriones somáticos**

FNL Macro stock: para 1 L	MS micro stock: para 0,5 L	Stock de vitaminas B5: para 1 L
(NH4)2SO4 4,63 g KNO3 28,30 g MgSO4.7H2O 3,70 g KH2PO4 1,85 g	H3BO3 3,100 g MnSO4.H2O 8,45 g ZnSO4.7H2O 4,30 g Na2MoO4.2H2O 0,125 g CuSO4.5H2O 0,0125 g CoCl2.6H2O 0,0125 g KI 0,4150 g	Thiamina.HCl 2,50 g Acid. Nicotínico 0,25 g Pyridoxina.HCl 0,25 g Myo-Inositol 25 g  Filtrar y alicuotar. Guardar a 4°C
Stock de calcio: para 1 L	Stock de Hierro: para 1 L	Stock de Glutamina: para 500 mL
CaCl2.2H2O: 44 g	Na2EDTA* 3,730 g Fe2SO4.7H2O 2,780 g  debe estar completamente disuelto antes de agregar	L-glutamina 20 g  Esterilizar por filtración y guardar protegido de la luz.
Stock de 2-4D:	Autoclavar y guardar protegido de la luz.	
2,4-D 200 mg/L filtrar		

Todos las soluciones se guardan a 4°C

Figura 17. Composición de soluciones stock para la inducción de embriones somáticos de soja

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Haleem H, Lee G-J y Boerma RH (2011) Identification of QTL for increased fibrous roots in soybean. *Theor. Appl. Genet.* (2011) 122-925.
- Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR y Rech EL (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet* 101:1-6.
- Bauer M y Gaskell G (2002) Researching the public sphere of biotechnology. In: *Biotechnology: The Making of a Global Controversy* (Gaskell, G. and Bauer, M., eds), pp. 1–19. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Buchheim JA, Colburn SM y Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89:768-775.
- Carter TE, Burton JW, Bowman DT, Cui Z, Zhou X, Villagarcia MR, Fountain MO y Niewoehner AS (2003) Registration of 'N7001' Soybean. *Crop Science* 43:1126-1127.
- Chiera JM, Bouchard RA, Dorsey SL, Park E, Buenrostro-Nava MT, Ling PP y Finer JJ (2007) Isolation of two highly active soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) promoters and their characterization using a new automated image collection and analysis system. *Plant Cell Rep.* 2007, 26: 1501-1509.
- Colson G y Huffman WE (2011) Consumers' willingness to pay for genetically modified foods with product-enhancing nutritional attributes. *Am. J. Agr. Econ.* 93, 358–363.
- Committee on Genetically Engineered Crops: Past Experience and Future Prospects; Board on Agriculture and Natural Resources; Division on Earth and Life Studies; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2016) *Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects*. THE NATIONAL ACADEMIES PRESS, pp 1-420 ISBN 978-0-309-43738-7 | DOI: 10.17226/23395
- Devos Y, Craig W y Schiemann J (2012) Transgenic crops, risk assessment and regulatory framework in the European Union. In *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology* (Meyers, R.A., ed.). New York: Springer, 10765–96.
- Dou D, Kale SD, Wang X, Chen Y, Wang Q, Wang X y Tyler BM (2008) Conserved C-Terminal Motifs Required for Avirulence and Suppression of Cell Death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *The Plant Cell*, 20, 1118–1133.
- Droste A, Pasquali G y Bodanese-Zanettini MH (2002) Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica* (2002) 127: 367. <https://doi.org/10.1023/A:1020370913140>.
- European Academies Science Advisory Council (2013) *Planting the future: opportunities and challenges for using crop genetic improvement technologies for sustainable agriculture*. European Academies Science Advisory Council Policy Report 21.
- Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang DL, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu X y Zhu JK. (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci.* 111, 4632–7.
- Finer JJ (1988) Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep.* 7:238-241.
- Finer JJ y Nagasawa A (1988). Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 15:125-136.
- Fuganti-Pagliarini R, Ferreira LC, Rodrigues FA, Molinari HBC, Marin SRR, Molinari MDC, Marcolino-Gomes J, Mertz-Henning LM, Farias JRB, de Oliveira MCN, Neumaier N, Kanamori N, Fujita Y, Mizoi J, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K y Nepomuceno AL (2017) Characterization of Soybean Genetically Modified for Drought Tolerance in Field Conditions. *Front Plant Sci.* 8, 448.

- Gallino JP, Ruibal C, Casaretto E, Fleitas AL, Bonnacarrère V, Borsani O y 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* 9:262 DOI: 10.3389/fpls.2018.00262.
- Garbarino JE y Belknap WR (1994) Isolation of a ubiquitin-ribosomal protein gene (*ubi3*) from potato and expression of its promoter in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 24: 119-127
- Gaskell G, Allansdottir A, Allum N, Castro P, Esmer Y, Fischler C, Jackson J, Kronberger N, Hampel J, Mejlgaard N, Quintanilha A, Rammer A, Revuelta G, Stares S, Torgersen H y Wager W (2011) The 2010 Eurobarometer on the life sciences. *Nat. Biotechnol.* 29, 113–114.
- Gaskell, G y Bauer M (2001) The years of controversy. In: *Biotechnology 1996–1999* (Gaskell, G. and Bauer, M., eds), pp. 3–11. London, UK: Science Museum Press.
- Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K y Blatt MR (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal* 64, 355–365.
- Hartung F y Schiemann J (2014) Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J.* 78, 742–52.
- Hernandez-Garcia CM, Bouchard RA, Rushton PJ, Jones ML, Chen X Timko MP y Finer JJ (2010) High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) GmERF and *GmUbi* gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. *BMC Plant Biology* 10:237.
- Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT y Horsch RB (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Nat. Biotechnol.* 1988, 6, 915–922.
- Hobbs SLA, Jackson JA y Mahon JD (1989) Specificity of strain and genotype in the susceptibility of pea to *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 1989, 8, 274–277.
- Holme IB, Wendt T y Holm PB (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol J* 11:395–407.
- Hufstetler, EV, Boerma HR, Carter TE y Earl HJ (2007) Genotypic Variation for Three Physiological Traits Affecting Drought Tolerance in Soybean. *Crop Sci* 47:25-35. doi: 10.2135/cropsci2006.04.0243.
- Hwang HH, Yu M, Lai E-M (2017) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications. *The Arabidopsis Book* 15: e0186. 2017.
- Ishige F, Takaichi M, Foster R, Chua N-H y Oeda K (1999) A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants. *Plant J.* 18: 443-448.
- James, C (2011) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. ISAAA Brief 43. Ithaca, NY: ISAAA.
- Jefferson RA (1988) Plant reporter genes: The GUS gene fusion system, in *Genetic Engineering*, Vol. 10 (Setlow J.K., ed.) Plenum Publishing Corporation, New York.
- Jefferson RA, Burgess SM y Hirsh D (1986)  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8447-8451.
- Jia Y, Yao X, Zhao M, Zhao Q, Du Y, Yu C y Xie F (2015) Comparison of Soybean Transformation Efficiency and Plant Factors Affecting Transformation during the *Agrobacterium* Infection Process. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 18522-18543.
- Lassen J, Madsen KH y Sandøe P (2002) Ethics and genetic engineering lessons to be learned from GM foods. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 24, 263–271.
- Li S, Cong Y, Liu Y, Wang T, Shuai Q, Chen N, Gai J y Li Y (2017) Optimization of *Agrobacterium*-Mediated Transformation in Soybean. *Front. Plant Sci.* 8:246. doi: 10.3389/fpls.2017.00246.
- Liu F, Anderson MN y Jacobson SE (2005) Effects of drought stress and N supply on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of *Sophora davidii* seedlings. *Environ Exp Bot.* 54, 33-40.

- Liu HK, Yang C y We ZM (2004) Efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybeans using an embryonic tip. *Planta*. 2004 Oct;219(6):1042-9. Epub 2004 Jul 16.
- Lusk JL y Rozan A (2006) Consumers acceptance of intergenic foods. *Biotechnol. J.* 1, 1–2.
- Lusk JL y Sullivan P (2002) Consumers acceptance of genetically modified foods. *Food Technol.* 56, 32–37.
- Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran LS y Nguyen HT (2009) Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiol.* 50, 1260-76.
- McBlain BA, Fioritto RJ, St Martin SK y Calip-Dubois AJ (1993) Registration of 'Thorne' soybean. *Crop Science* 33:1405-1406.
- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 26, 99-109.
- Nickell C D, Noel GR, Thomas DJ y Waller R (1990) Registration of 'Jack' soybean. *Crop Science*.30: 365.
- Nielsen KM (2003) Transgenic organisms - time for conceptual diversification? *Nat. Biotechnol.* 21, 227–228.
- Pan C, Ye L, Qin L, Liu X, He Y, Wang J, Chen L y Lu G (2016) CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports*, 6, 24765. <http://doi.org/10.1038/srep24765>
- Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM y Wang K (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.* 25:206-13.
- Puchta H y Fauser F (2013) Gene targeting in plants: 25 years later. *Int J Dev Biol.* 57, 629-37.
- Ray DK, Mueller ND, West PC y Foley JA (2013) Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *Plos One.* 8,66428.
- Samoylov VM, Tucker DM y Parrott WA (1998) Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 34:8-13.
- Santarém ER y Finer JJ (1999) Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* (1999) 35: 451. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0067-0>
- Sauer B y Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 5166-70.
- Schaart JG, Krens FA, Pelgrom KTB, Mendes O y Rouwendal GJA (2004) Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnol. J.* 2, 233–240.
- Schouten HJ, Krens FA y Jacobsen E (2006) Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Rep* 7:750–753.
- Sinclair TR, Serraj R. Legume nitrogen fixation and drought (1995) *Nature* 378, 344.
- Singh A, Joshi M, Lamalakshmi y Devi, E (2015). Alternative to Transgenesis: Cisgenesis and Intragenesis. 345-367. [10.1007/978-3-319-22521-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0_12).
- Sternberg N y Hamilton D (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.* 25, 467-86.
- Tilman D, Balzer C, Hill J y Befort BL (2011) Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci.* 108:20260–64.
- Tzfira T y Citovsky V (2000) From host recognition to T-DNA integration: The function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Mol. Plant Pathol.* 2000, 1, 201–212.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* (2003), 33, 949-956.
- Winkler RG, Polacco JC, Blevins DG y Randall DD (1985). Enzymatic degradation of allantoin in developing soybeans. *Plant Physiology.* 79, 787-793.

- Wright MS, Launis KL, Novitzky R, Duesing JH y Harms CT (1991) A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. In *Vitro Cell.Dev.Biol.* 27P:153-157.
- Yukawa K, Kaku H, Tanaka H, Koga-Ban Y y Fukuda M (2008) Enhanced soybean infection by the legume "super-virulent" *Agrobacterium tumefaciens* strain KAT23. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, 72, 1809–1816.
- Zhang J, Nguyen HT y Blum A (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.* 50, 292–302.
- Zia M, Rizvi ZF, Rehman RU y Chaudhary MF (2010) *Agrobacterium* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): Some conditions standardization. *Pak. J. Bot.* 2010, 42, 2269–2279.
- Zuo J, Niu QW y Chua NH (2000) An estrogen receptor based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* 24: 265-273.
- Zuo J, Niu QW, Moller SG y Chua NH (2001) Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotech.* 19: 157-161.



Setiembre de 2018  
PRONTOGRAFICA S.A.  
Cerro Largo 850 - Tel.: 2902 3172  
E-mail: pgrafica@adinet.com.uy  
Depósito Legal 374.080

**INIA Dirección Nacional**  
Andes 1365 P. 12  
Montevideo  
Tel.: ++598 2902 0550  
Fax: ++598 2902 3633  
[iniadn@inia.org.uy](mailto:iniadn@inia.org.uy)

**INIA La Estanzuela**  
Ruta 50 Km. 11  
Colonia  
Tel.: ++598 4574 8000  
Fax: ++598 4574 8012  
[iniale@le.inia.org.uy](mailto:iniale@le.inia.org.uy)

**INIA Las Brujas**  
Ruta 48 Km. 10  
Canelones  
Tel.: ++598 2367 7641  
Fax: ++598 2367 7609  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)

**INIA Salto Grande**  
Camino al Terrible  
Salto  
Tel.: ++598 4733 5156  
Fax: ++598 4732 9624  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)

**INIA Tacuarembó**  
Ruta 5 Km. 386  
Tacuarembó  
Tel.: ++598 4632 2407  
Fax: ++598 4632 3969  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)

**INIA Treinta y Tres**  
Ruta 8 Km. 281  
Treinta y Tres  
Tel.: ++598 4452 2023  
Fax: ++598 4452 5701  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)