



## **FACULTAD DE FARMACIA**

Grado en Farmacia

Biblioteca

# **OBTENCIÓN DE PLANTAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* CON LA CONSTRUCCIÓN *HEN4p::GFP-HEN4***

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2024

**Autor: Fatima Zohra Boubidi Alioua**

Modalidad: Experimental

Tutores: Antonio Martínez Laborda y Encarnación Rodríguez Cazorla

## INDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	5
2.2. El gen <i>HEN4</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	6
2.3. La clonación molecular.....	9
2.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y el T-DNA.....	12
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
4.1. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	16
4.1.1. Cultivo en placas de Petri .....	16
4.1.2. Cultivo en maceta.....	16
4.2. Cultivo de organismos bacterianos .....	16
4.2.1. Estirpes utilizadas .....	16
4.2.2. Cultivo de los organismos bacterianos .....	17
4.3. Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	17
4.3.1. Aislamiento de DNA genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
4.3.2. Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa.....	18
4.3.3. Purificación de DNA plasmídico .....	18
4.3.4. Electroforesis en gel de agarosa .....	18
4.4. Clonación de DNA.....	18
4.5. Oligonucleótidos utilizados .....	19
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>20</b>
5.1. Obtención de los segmentos de DNA a clonar .....	20
5.2. Clonación de los fragmentos de DNA .....	23
5.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i> y secuenciación .....	24
5.4. Transformación de <i>Agrobacterium</i> con el plásmido recombinante .....	26
5.5. Transformación de plantas de <i>Arabidopsis</i> con <i>Agrobacterium</i> .....	26
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>32</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>33</b>

## 1. RESUMEN

Se presenta un trabajo de investigación en el que se emplea *Arabidopsis thaliana*, una planta modelo muy utilizada en estudios de Genética. El objetivo principal fue obtener plantas transgénicas con la construcción genética *HEN4p::GFP-HEN4*, que consiste en una fusión transcripcional y traduccional entre los genes *GFP*, de la medusa *Aequorea victoria*, y *HEN4*, de *Arabidopsis*, cuya expresión está controlada por el promotor del gen *HEN4* (*HEN4p*). Esta construcción da lugar a una proteína de fusión GFP-HEN4 que cabe esperar que presente la misma localización tisular e intracelular que la proteína HEN4 nativa. GFP es una proteína verde fluorescente, fácilmente visible con microscopios de fluorescencia, mientras que HEN4 es un producto proteico implicado en la regulación de diferentes procesos reproductivos de *Arabidopsis*.

La construcción se generó en el vector pGreenII 0179, utilizando una técnica de clonación basada en ensamblaje de DNA (*DNA assembly*). Este método facilitó la hibridación de secuencias solapantes entre los insertos y entre éstos y el vector para formar un plásmido recombinante circular que se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis* mediante el método de *floral dipping*. Se comprobó la presencia de la construcción en las plantas transgénicas resultantes mediante selección en higromicina y por PCR. Además, se visualizaron células de la raíz con un microscopio confocal, observándose fluorescencia principalmente en el núcleo.

Este estudio demuestra la eficiencia del proceso de clonación mediante ensamblaje de DNA, transformación y obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan genes de interés, como la fusión génica obtenida en este trabajo que servirá para comprobar la localización de la proteína de fusión en los tejidos y células de la planta y, en consecuencia, de la proteína HEN4 nativa.

**Palabras clave:** *Arabidopsis thaliana*, clonación molecular, ensamblaje de DNA, *HEN4*, transformación.

## **ABSTRACT:**

A research study is presented in which *Arabidopsis thaliana*, a model plant widely used in genetic studies, is employed. The main objective was to obtain transgenic plants with the genetic construct *HEN4p::GFP-HEN4*, which consists of a transcriptional and translational fusion between the *GFP* gene from the jellyfish *Aequorea victoria* and the *HEN4* gene from *Arabidopsis*, whose expression is controlled by the *HEN4* gene promoter (*HEN4p*). This construct gives rise to a GFP-HEN4 fusion protein, which is expected to exhibit the same tissue and intracellular localization as the native HEN4 protein. GFP is a green fluorescent protein, easily visible with fluorescence microscopes, while HEN4 is a protein involved in regulating reproductive processes in *Arabidopsis*.

The construct was generated in pGreenII 0179 vector, using a cloning technique based on DNA assembly. This method facilitated the hybridization of overlapping sequences between the inserts and between the inserts and the vector to form a recombinant circular plasmid that was used to transform *Arabidopsis* plants via the floral dipping method. The presence of the construction in the resulting transgenic plants was confirmed by the selection on hygromycin and PCR. Additionally, root cells were visualized with a confocal microscope observing fluorescence mainly in the nucleus.

This study demonstrates the efficiency of the cloning process via DNA assembly, transformation, and the obtaining of transgenic *Arabidopsis* plants that express genes of interest, such as the gene fusion obtained in this work, which will serve to verify the localization of the fusion protein in the tissues and cells of the plant and, consequently, the native HEN4 protein.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, molecular cloning, DNA assembly, *HEN4*, transformation.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (de aquí en adelante *Arabidopsis*) es una planta herbácea que pertenece a la familia Brassicaceae, la misma familia de plantas del repollo y la mostaza (Figura 1). Esta planta es ampliamente utilizada como modelo experimental en la investigación en Biología Vegetal y Genética, debido a que es una planta pequeña, lo que facilita su manejo, con un ciclo de vida relativamente corto, de 6-8 semanas, tiene un genoma relativamente compacto, que facilita el análisis genético y genómico, y se reproduce por autogamia, lo que facilita los estudios de Genética y la obtención de líneas mutantes. Por las razones indicadas, hemos utilizado esta planta para desarrollar el presente trabajo.

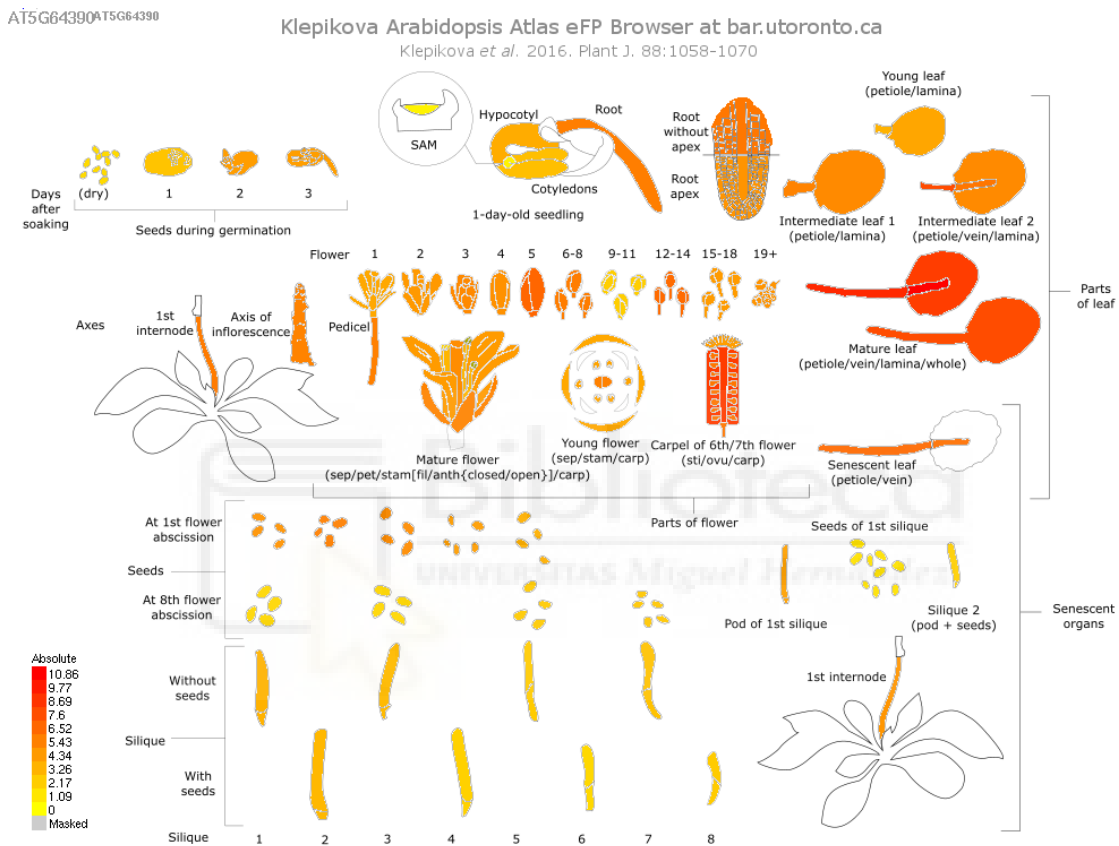


**Figura 1.- Dibujo de una planta desarrollada de *Arabidopsis thaliana*.**

---

## 2.2. El gen *HEN4* de *Arabidopsis thaliana*

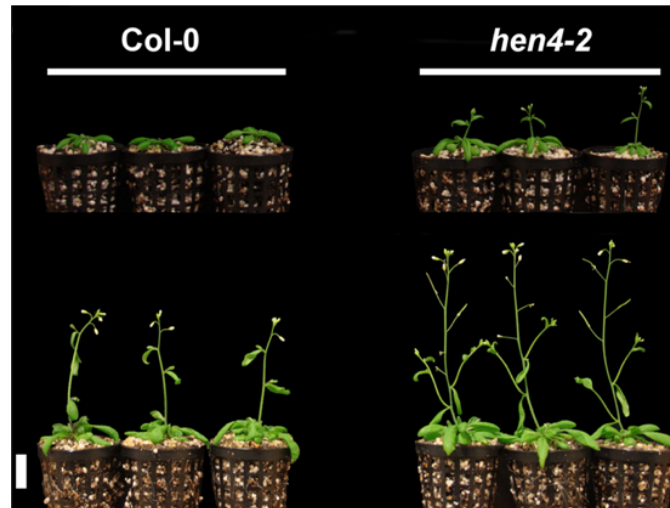
El gen *HUA ENHANCER4* (de ahora adelante *HEN4*), que codifica una proteína con 5 dominios de unión a RNA de tipo K-homology (KH), tiene una expresión ubicua en la planta, detectándose su RNA mensajero en todos los órganos (Figura 2).



**Figura 2.- Patrón de expresión de *HEN4* en *Arabidopsis thaliana*.** Detección de RNA mensajero en los diferentes tejidos a lo largo de las fases de desarrollo de *Arabidopsis*<sup>1</sup>.

Gracias a numerosos estudios, se sabe que tiene diferentes funciones. Entre ellas, participa en la regulación del tiempo de floración, gracias a que controla positivamente genes clave como *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) y *MAF4* (*MADS AFFECTING FLOWERING 4*), que se encargan de retrasar o inhibir la floración hasta que la planta esté en las condiciones adecuadas. En consecuencia, se ha demostrado que una mutación de pérdida de función en

*HEN4* provoca una floración temprana (Figura 3), con acortamiento de la fase juvenil vegetativa<sup>2</sup>.



**Figura 3.- Plantas silvestres (Col-0) y plantas mutantes *hen4-2*.** Las plantas con la mutación de pérdida de función *hen4-2* florecen más rápido que las silvestres<sup>2</sup>.

A nivel postranscripcional, mediante su contribución a la actividad HUA-PEP, en la que están implicados los genes *HUA1*, *HUA2*, *HEN4*, *PEP* y *FLK*, que codifican proteínas de unión a RNA, participa en la determinación de los órganos florales a través de la regulación positiva del gen homeótico floral *AGAMOUS* (*AG*), que codifica un factor de transcripción con dominio MADS-box<sup>3,4</sup>.

Las flores de *Arabidopsis* están formadas por cuatro verticilos florales. Un primer verticilo externo que consta de cuatro sépalos. A continuación, un segundo verticilo formado por cuatro pétalos. Más internamente, un tercer verticilo con seis estambres; y, finalmente, un cuarto verticilo interno que tiene un pistilo que consta de dos carpelos (Figura 4A).

Se sabe que *Arabidopsis* sigue el modelo ABC(E) para el desarrollo de sus órganos florales<sup>5</sup>. Siguiendo este modelo, la co-expresión en el tercer verticilo de los genes de función B, del gen *AG*, de función C, y de los genes *SEPALLATA* (*SEP1*, *SEP2* y *SEP3*), que determinan la función E, va a dar lugar a la formación de los estambres, mientras que la única expresión del gen *AG* en el cuarto verticilo junto a la de los genes *SEP* dará lugar a la formación de los

carpelos. Por otro lado, *AG* tiene un rol crucial para que el meristemo floral sea una estructura determinada que finaliza con la formación del cuarto verticilo. En ausencia de la función de *AG*, que se observa en los mutantes de pérdida de función en el gen y en combinaciones de mutaciones de pérdida de función en genes de la actividad HUA-PEP, incluido *HEN4*, se ven afectados los estambres y los carpelos, que sufren transformaciones homeóticas a pétalos y sépalos, respectivamente, y la flor no termina en el cuarto verticilo, observándose el típico fenotipo de flor dentro de flor (Figura 4B,C)<sup>3</sup>.



**Figura 4.- Flores de plantas mutantes hua-pep, portadoras de alelos de pérdida de función de *HEN4*.** **A)** Flor de una planta silvestre Col-0 a la que se le han eliminado un sépalo y dos pétalos. **B)** Flor hua-pep en la que aparecen pétalos en el tercer verticilo en lugar de estambres. **C)** Pistilo de una flor hua-pep a la que se le ha retirado un carpelo dejando ver otra flor que se ha desarrollado en su interior. Barras de escala: 1 mm<sup>3</sup>.

*HEN4*, además, participa en el desarrollo del óvulo, ya que la actividad HUA-PEP regula positivamente la expresión del gen *AG* (Figura 5), así como la de los genes de la función D, *SHATTERPROOF 1 (SHP1)*, *SHP2* y *SEEDSTICK (STK)*. Estos cuatro genes son los encargados principales de la identidad del óvulo<sup>6,7</sup>.





**Figura 5.- Pistilo de una planta mutante hua-pep.** Se muestra el interior de un pistilo en el que aparecen estructuras verdes y alargadas, similares a pequeños sépalos, en lugar de óvulos<sup>6</sup>.

---

El laboratorio de Genética me propuso generar plantas transgénicas que portasen la construcción *HEN4p::GFP-HEN4*. Se trata de un gen recombinante formado por *GFP*, un gen testigo que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), y a continuación la región genómica codificante del gen *HEN4*, insertada manteniendo la pauta de lectura de codones, y el terminador de la transcripción del gen de *Arabidopsis*, todo ello bajo el control del promotor del propio gen *HEN4*. La expresión de este gen recombinante da lugar a una proteína de fusión que contiene las proteínas GFP y HEN4, que nos permitirá determinar los órganos y regiones subcelulares en los que se expresa *HEN4* tanto en fondo silvestre como en diversos fondos mutantes.

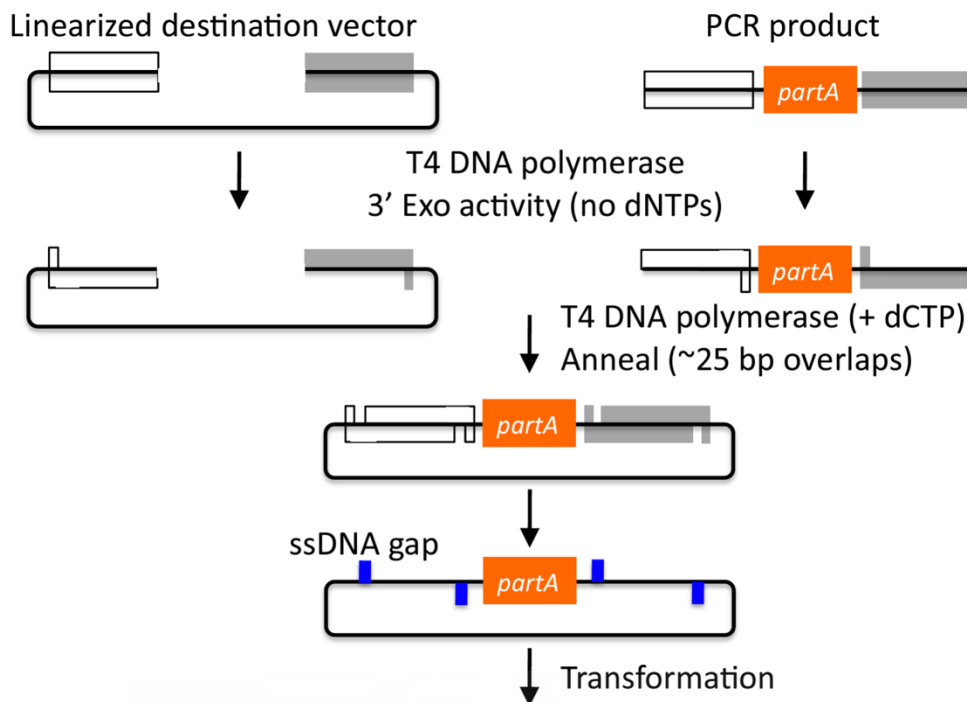
### **2.3. La clonación molecular**

La clonación molecular es una técnica en la que se insertan fragmentos de DNA específicos en vectores capaces de replicarse en una especie hospedadora. Esto da lugar, por ejemplo, a un plásmido recombinante capaz de replicarse en el hospedador, permitiendo la obtención de copias exactas del fragmento de DNA (inserto) introducido en el vector. Se usa en Biología Molecular y Genética para estudiar genes, producir proteínas y crear organismos genéticamente modificados.

Es un área muy amplia, en la que existen muchas técnicas, cada una con sus ventajas y desventajas. La elección de la técnica depende del objetivo, tipo de secuencia a clonar, precisión requerida y recursos del laboratorio.

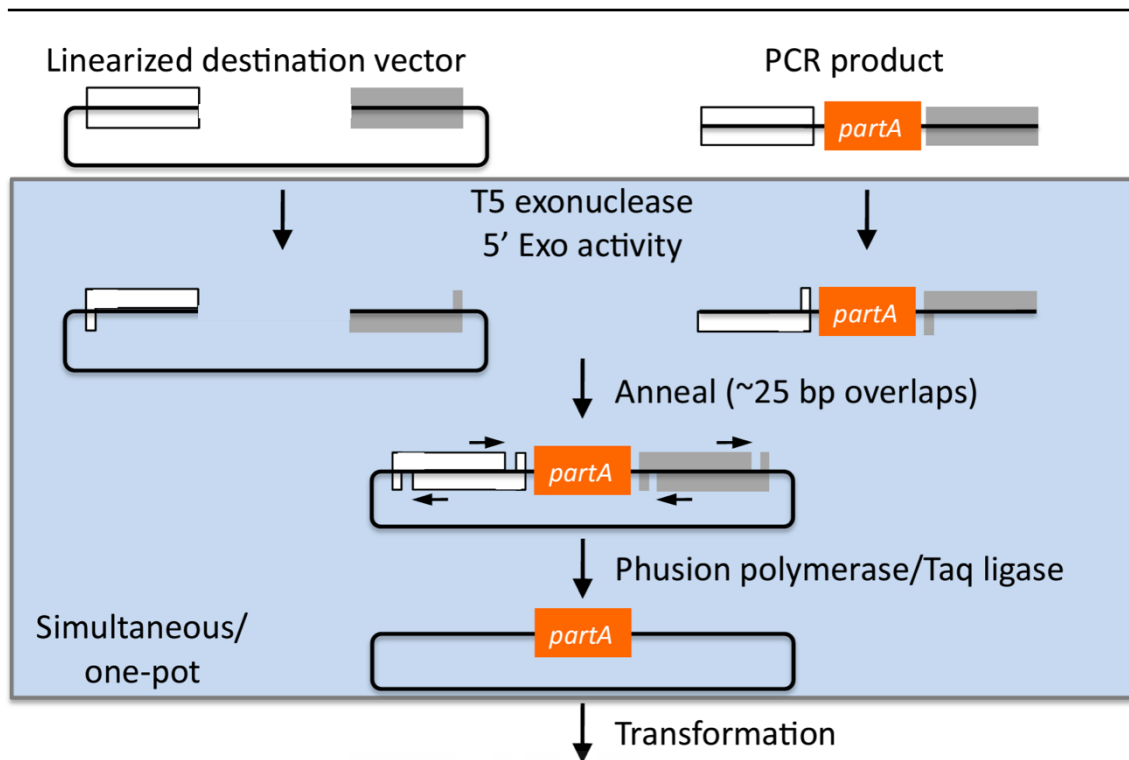
En nuestro caso, se han utilizado técnicas de ensamblaje de DNA, que permiten unir varios fragmentos de DNA (como es el caso de nuestra construcción *HEN4p::GFP-HEN4*), sin la necesidad de utilizar las enzimas de restricción tradicionales. Dos técnicas muy utilizadas son:

- a. **SLIC** (*Sequence and Ligase Independent Cloning*). Tal y como indica su nombre, esta técnica, además de no depender de enzimas de restricción, no emplea ligasa de DNA. Consiste en amplificar por PCR el fragmento de DNA a insertar, utilizando como cebadores oligonucleótidos que contienen alrededor de 25 pares de bases de homología con los extremos del vector linealizado. El vector de destino se linealiza mediante digestión con enzimas de restricción o mediante amplificación por PCR. A continuación, tanto el vector como el producto de PCR se tratan con polimerasa de DNA de T4 en ausencia de desoxirribonucleósidos trifosfato. En estas condiciones, la polimerasa de T4 presenta actividad exonucleasa 3', degradando ambos extremos del DNA en sentido 3' a 5', lo que crea extremos complementarios entre el producto de PCR y el vector. Al agregar cualquier desoxirribonucleósido trifosfato, se detiene la reacción exonucleasa. En un siguiente paso, se mezclan el vector linealizado y el producto de PCR para que se unan los extremos complementarios. Como no se utiliza ligasa de DNA, el resultado es un plásmido con mellas no selladas covalentemente que se reparan después de la transformación en *Escherichia coli* (Figura 6)<sup>8</sup>.



**Figura 6.- Esquema de clonación molecular por el método SLIC<sup>8</sup>.**

**b. Gibson.** Es un análogo del método SLIC del que se diferencia por la utilización de una exonucleasa que actúa en sentido 5' a 3', una polimerasa de DNA para rellenar posibles huecos y una ligasa de DNA para sellar las mellas en las cadenas. En el proceso, se emplea una mezcla de tres enzimas que contiene la exonucleasa de T5, la polimerasa de DNA *Phusion* y la ligasa de DNA Taq. El vector linealizado y el producto de PCR se mezclan con las tres enzimas. La exonucleasa T5 degrada ambos fragmentos de DNA en sentido 5' a 3'. A continuación, la polimerasa *Phusion* rellena los huecos y, finalmente, la ligasa de DNA sella las uniones. Todo tiene lugar en un mismo tubo sin necesidad de pasos adicionales y a una temperatura más alta que la de la técnica SLIC, lo que reduce los problemas relacionados con las estructuras secundarias (Figura 7)<sup>8</sup>.



**Figura 7- Esquema de clonación por el método Gibson<sup>8</sup>.**

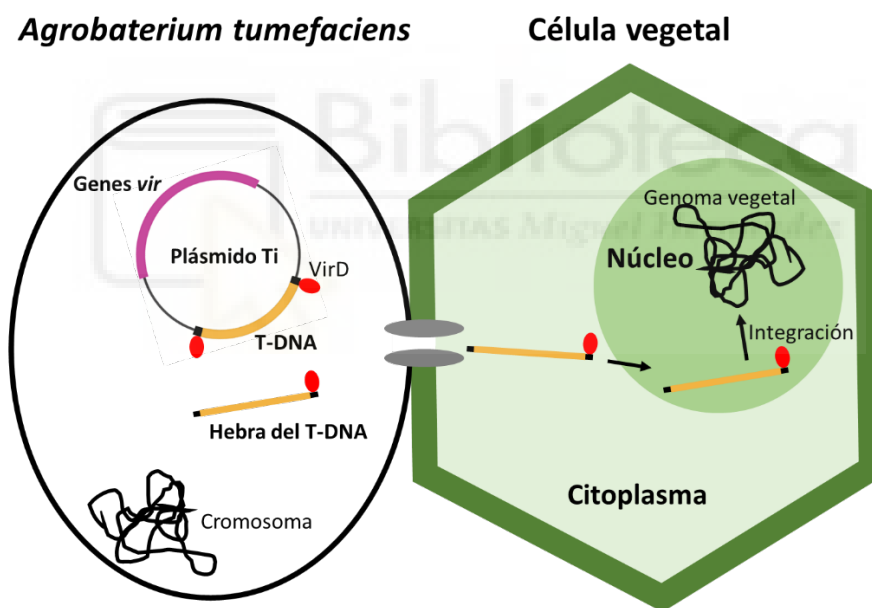
En este trabajo, se ha hecho uso del kit *GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix*, desarrollado por Life Technologies. Este método de ensamblaje da el mismo resultado que las técnicas mencionadas anteriormente y el mismo producto final. La diferencia respecto a las técnicas estándar es que requiere extremos con solamente 15 pares de bases de homología entre el producto de PCR y el vector y se realiza a temperatura ambiente, siendo más rápida y sencilla.

#### **2.4. *Agrobacterium tumefaciens* y el T-DNA**

*Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium* de ahora en adelante), es una bacteria que vive en el suelo, con capacidad de infectar a plantas para utilizarlas en su propio beneficio. Esto es así porque tiene la capacidad de transferir una parte de su DNA, una región del plásmido Ti (*Tumour inducing*), integrándolo en el genoma de planta. El plásmido Ti contiene dos elementos principales: la región

que transfiere o T-DNA (DNA transferido) y los genes *vir* o genes de virulencia, cuyos productos aportan las funciones *trans* necesarias para la transferencia del T-DNA. Una vez integrado en el genoma de la planta, ésta va a expresar genes contenidos en el T-DNA que van a dirigir la síntesis de auxinas y citoquininas, provocando un tumor conocido como agalla en corona, y la de opinas que son una fuente de energía para *Agrobacterium*.

La transferencia del T-DNA comienza con la expresión de genes *vir* del plásmido Ti. La endonucleasa *VirD* produce cortes en los extremos del T-DNA, llamados brazos izquierdo y derecho (LB, left border, y RB, right border). El T-DNA cortado es transportado a la célula de la planta en cuyo genoma se integra al azar (Figura 8)<sup>9</sup>.



**Figura 8.- Mecanismo de transferencia e integración de T-DNA en el genoma de una planta.**

En Ingeniería Genética, se puede hacer uso de esta capacidad de transformación para generar plantas transgénicas utilizando este sistema, aunque con modificaciones. Para la transferencia génica en plantas, se pueden emplear plásmidos en los cuales los genes que inducen tumores y opinas del T-DNA son sustituidos por el segmento de DNA de interés, conservando los genes

*vir* del plásmido Ti. Otra opción, empleada en este trabajo, es la utilización de un sistema de vectores binarios, que consiste en el uso de dos plásmidos, uno que contiene el T-DNA a transferir, con los brazos izquierdo y derecho, y otro que contiene los genes *vir*<sup>10</sup>.



### 3. OBJETIVOS

Los objetivos generales y principales de este trabajo han sido:

1. Generar una construcción con la fusión génica *HEN4p::GFP-HEN4*
2. Obtener plantas transgénicas con esta construcción.
3. Observar la correcta función de la construcción en Arabidopsis

Los objetivos específicos son:

1. Adquirir conocimientos sobre el manejo de ácidos nucleicos, como amplificación, purificación, etc.
2. La comprensión de técnicas de clonación
3. Aprendizaje básico de cultivos de Arabidopsis y estirpes bacterianas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium*.



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Cultivo de *Arabidopsis thaliana***

#### **4.1.1. Cultivo en placas de Petri**

Se realizó la siembra de semillas en una cabina de flujo laminar horizontal. Primero, se esterilizaron las semillas con etanol y una solución de lejía al 40%, y se realizaron lavados con agua destilada estéril. A continuación, se resuspendieron las semillas en agar 0,1% y se distribuyeron por la superficie de una placa de Petri con medio de germinación (2,15 g/L de sales MS, 10 g/L de sacarosa y 0,5 g/L de MES) suplementado con higromicina cuando fue necesario. Finalmente, se dejó secar y se cerró utilizando una cinta adhesiva que permite la circulación de gases. Las placas se estratificaron durante 2 días a 4°C para conseguir una germinación homogénea y, pasado ese periodo, se trasladaron a una cámara de cultivo a 21°C.

#### **4.1.2. Cultivo en maceta**

Este método se utilizó para permitir a la planta completar su desarrollo comenzado en la placa de Petri.

Se trasplantaron las plantas de la placa de Petri a macetas de plástico con el sustrato compuesto por una mezcla de perlita, vermiculita y turba (2:2:1), y se colocaron en bandejas con una solución que contenía los nutrientes necesarios para el desarrollo de *Arabidopsis*.

Las bandejas de plástico se conservaron en una cámara de cultivo a 21°C, 50-60% de humedad y luz generada por tubos fluorescentes de luz blanca fría (Sylvania Standard F65W), donde las plantas completaron su ciclo vital.

### **4.2. Cultivo de organismos bacterianos**

#### **4.2.1. Estirpes utilizadas**



Se emplearon células quimiocompetentes de la estirpe DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (*E. coli*) para la clonación del plásmido recombinante con la construcción *HEN4p::GFP-HEN4*. En cuanto a *Agrobacterium*, se utilizaron células electrocompetentes de la cepa C58C1 que tienen incorporado el plásmido pSOUP, portador de los genes *vir*.

#### **4.2.2. Cultivo de los organismos bacterianos**

Los cultivos en medio líquido se realizaron en recipientes llenándolos hasta la mitad de su capacidad como máximo, para garantizar una aireación suficiente. La incubación se realizó en un incubador de agitación orbital, a 150 revoluciones por minuto (rpm).

Para la extracción de plásmido en *E. coli*, los cultivos se incubaron a 37°C durante toda la noche. Para la transformación de las plantas, se incubó *Agrobacterium* a 28°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8 a una longitud de onda de 600 nm (2-3 días).

En el caso de los cultivos sólidos, las placas se incubaron en estufas reguladas a 37°C durante toda la noche para *E. coli* y a 28°C durante 2 días para *Agrobacterium*.

Para *E. coli*, se utilizó el medio de cultivo LB (Luria-Bertani; 10 g/L de NaCl 1% (m/v), extracto de levadura 5 g/L y triptona 10 g/L) a pH 7,5 y esterilizado en autoclave. Para *Agrobacterium*, se utilizó el mismo medio, pero suplementado con glucosa (5 g/L). Para realizar cultivos en placas de Petri, se añadieron 15 g/L de agar a estos medios. Además, se incorporaron antibióticos como agentes selectores (50  $\mu$ g/L de kanamicina, 5  $\mu$ g/L de tetraciclina) cuando fue necesario.

#### **4.3. Obtención y manipulación de ácidos nucleicos**

##### **4.3.1. Aislamiento de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana***

Se utilizó el kit GeneJET Plant Genomic DNA Purification de Thermo Scientific, siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto que se obtuvo finalmente se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua destilada estéril.

#### **4.3.2. Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa**

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR y recortados de un gel de agarosa tras electroforesis fueron purificados mediante el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific). El segmento de DNA resultante se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua.

#### **4.3.3. Purificación de DNA plasmídico**

Para extraer plásmidos de cultivos bacterianos, se utilizó el kit GenJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). Los plásmidos se resuspendieron en 50  $\mu$ l de agua.

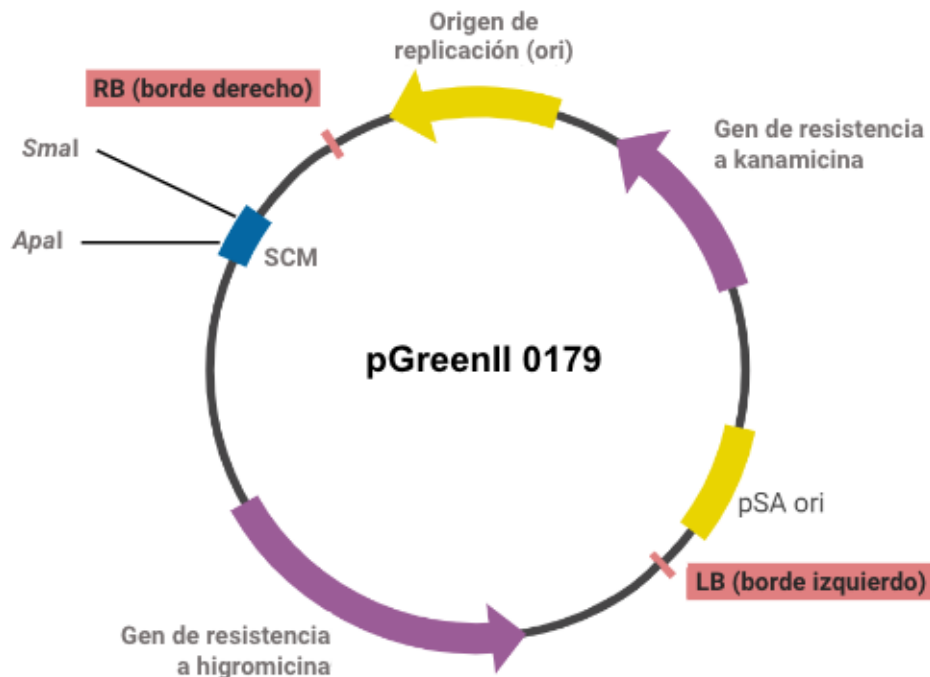
#### **4.3.4. Electroforesis en gel de agarosa**

Se utilizó para verificar la integridad del DNA genómico una vez aislado, y para separar los fragmentos obtenidos mediante PCR.

Los geles de agarosa se prepararon con una concentración de 1%. La electroforesis se realizó a un voltaje de 100 V, y el resultado se visualizó irradiando con luz UV en un documentador de geles con una cámara canon 1000D acoplada.

#### **4.4. Clonación de DNA**

Para la clonación de fragmentos de DNA en un plásmido, se usó el kit *GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix* (Life Technologies). Se utilizó el vector plasmídico pGreenII 0179, que contiene un gen para resistencia a higromicina en *Arabidopsis* y un gen para resistencia a kanamicina en las bacterias. El vector se linealizó mediante digestión con las enzimas de restricción *Sma*I y *Ap*aI (Figura 9).



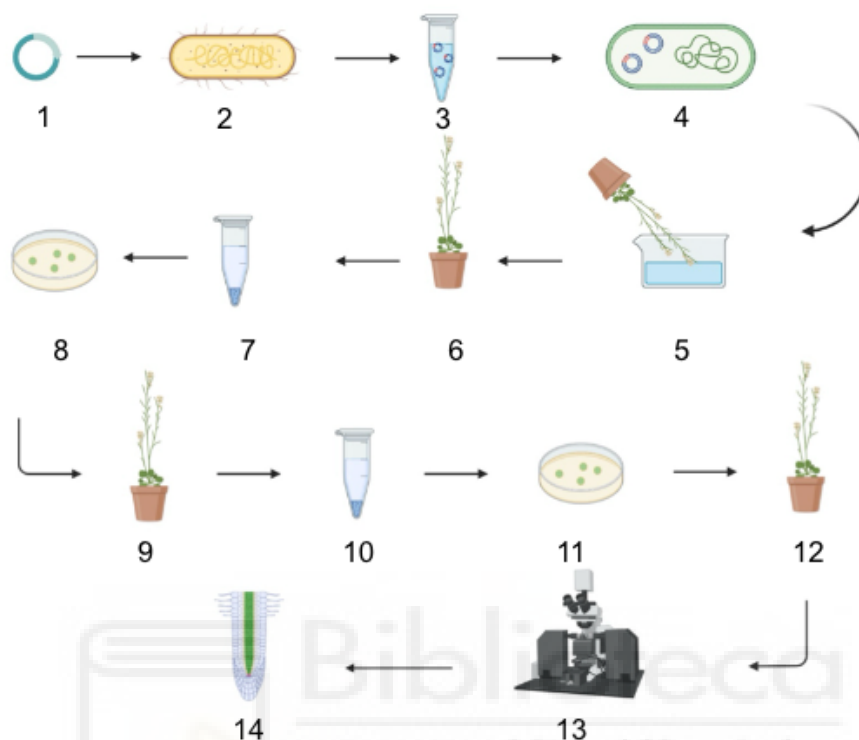
**Figura 9.- Vector pGreenII 0179 utilizado para clonar los fragmentos de la construcción.** Se indican las posiciones de las dianas para las enzimas *SmaI* y *ApaI*, utilizadas para linealizar este vector. SCM: sitio de clonación múltiple.

#### 4.5. Oligonucleótidos utilizados

**Tabla 1.- Oligonucleótidos empleados en este trabajo.** Las secuencias necesarias para el ensamblaje del DNA están indicadas en gris.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
SJ1-384	GGCGAATTGGGTACCGGGCCTCGC TTCTCTTGTCGCC	Fragmento <i>HEN4p</i>
SJ1-385	CCTTGCTCACCATTATCTCTCCTCTCTCC CTC	Fragmento <i>HEN4p</i>
SJ1-386	AGAGATAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	Fragmento <i>GFP</i>
SJ1-387	TATTCGCTCAGCGGCAGCGGCCG	Fragmento <i>GFP</i>
SJ1-388	CGCTGCCGCTGAGCGAAATAGCGTTAAATT TCATG	Fragmento <i>HEN4</i>
SJ1-389	AGGGAACAAAAGCTGGAGCTTACCTCCTGA GCTACGGC	Fragmento <i>HEN4</i>
SJ1-397	AACGGCATCAAGGTGAACTTC	Identificación de la construcción
SJ1-398	TCGAATACCTTAATCAACGCTCC	Identificación de la construcción

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



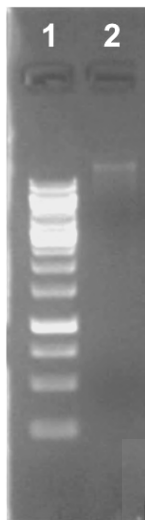
**Figura 10.- Esquema de los pasos llevados a cabo en este trabajo.**

- |  |   |
|--|---|
| 1. Plásmido recombinante.                      | 9. Desarrollo de plantas resistentes T <sub>1</sub> . |
| 2. Transformación de <i>E. coli</i> .          | 10. Semillas T <sub>2</sub> .                         |
| 3. Purificación del plásmido.                  | 11. Selección de T <sub>2</sub> en higromicina.       |
| 4. Transformación de <i>Agrobacterium</i> .    | 12. Plantas T <sub>2</sub> .                          |
| 5. Transformación de <i>Arabidopsis</i> .      | 13. Microscopio confocal.                             |
| 6. Plantas T <sub>0</sub> .                    | 14. Fluorescencia en raíces de plantas transgénicas   |
| 7. Semillas T <sub>1</sub> .                   |   |
| 8. Selección de T <sub>1</sub> en higromicina. |   |

### 5.1. Obtención de los segmentos de DNA a clonar

En primer lugar, en un tubo eppendorf, se machacaron 10 rosetas del ecotipo silvestre Columbia-0 (Col-0) de 12 días de edad, y se obtuvo su DNA genómico con la ayuda de kit GeneJET Plant Genomic DNA Purification (Thermo Scientific). El DNA purificado se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua destilada.

Posteriormente, se determinó la concentración del DNA utilizando un fotómetro, siendo ésta de 38 µg/mL. Además, para comprobar la integridad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando una alícuota de 2 µL (Figura 11).



**Figura 11.- Electroforesis de una alícuota de DNA genómico obtenido a partir de plantas Col-0.** Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: DNA genómico.

A continuación, se amplificaron por PCR los diferentes fragmentos de DNA que van a conformar los insertos del plásmido recombinante. Los segmentos amplificados son los siguientes: la secuencia del promotor de *HEN4* (*HEN4p*), la secuencia del gen *GFP* y la región codificante de *HEN4* con la región terminadora del gen. Las secuencias promotora y codificante de *HEN4* se obtuvieron utilizando como molde el DNA genómico previamente extraído. El gen *GFP* se obtuvo empleando como molde el plásmido pEGAD, proporcionado por el laboratorio de Genética, que contiene la secuencia de dicho gen. Las secuencias de los cebadores utilizados están recogidas en la Tabla 1 (página 19).

La enzima utilizada para la amplificación por PCR fue la Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), que tiene una elevada procesividad, siendo capaz de sintetizar cadenas de DNA de más de 7 Kb con gran fidelidad, gracias a su actividad exonucleasa 3' → 5' correctora de errores.

Las condiciones para la amplificación de los segmentos a insertar en el vector pGreenII 0179 fueron las siguientes: tampón de PCR 1X (con MgCl<sub>2</sub>), 0,8

mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleósido trifosfato (0,2 mM de cada uno de ellos), 1  $\mu$ M de la pareja de cebadores específica del segmento a amplificar (0,5  $\mu$ M de cada cebador), 1 unidad de la polimerasa de DNA Phusion y 2 ng/ $\mu$ L de DNA molde.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), con un paso inicial de 2 minutos a 98°C seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a la temperatura óptima de hibridación de los cebadores (60-70°C) y entre 20-170 segundos de síntesis de DNA a 72°C (15-30 s/kb). En el paso final, se programó una fase de elongación de 10 minutos a 71°C para completar la síntesis de los fragmentos que hubieran quedado incompletos durante los ciclos de amplificación.

En la Tabla 2, se indican los oligonucleótidos empleados, tamaños esperados, así como las condiciones de PCR utilizadas específicas para cada fragmento.

**Tabla 2- Condiciones de las PCR para cada fragmento de la construcción *HEN4p::GFP-HEN4*.**

	<i>HEN4p</i>	<i>GFP</i>	<i>HEN4</i>
<b>DNA molde</b>	DNA genómico de Col-0	Plásmido pEGAD	DNA genómico de Col-0
<b>Oligonucleótidos</b>	SJ1-384 + SJ1-385	SJ1-386+ SJ1-387	SJ1-388 + SJ1-389
<b>Tamaño esperado</b>	~1500 pb	~760 pb	~5500 pb
<b>Temperatura de hibridación</b>	62,3°C	68,2°C	62,3°C
<b>Tiempo de síntesis</b>	45 segundos	23 segundos	2 minutos 45 segundos

A continuación, se procedió a realizar electroforesis en gel de agarosa al 1% de cada una de las tres reacciones de PCR, junto con un marcador de peso molecular que servirá de referencia para deducir los tamaños de los fragmentos amplificados. Una vez concluida, con la ayuda de un bisturí y bajo una lámpara de luz UV, se cortaron las secciones del gel de agarosa que contenían los fragmentos de los tamaños esperados, guardando cada uno en un tubo eppendorf. Posteriormente, se extrajo el DNA de las secciones del gel utilizando

el kit GenJet Gel Extraction, siguiendo las instrucciones del fabricante, y resuspendiendo el DNA en 20  $\mu\text{L}$  de agua.

Finalmente, se cuantificaron los productos de esta purificación utilizando un fotómetro, obteniéndose las siguientes concentraciones, 31,6  $\text{ng}/\mu\text{L}$  del fragmento *HEN4p*, 44.9  $\text{ng}/\mu\text{L}$  del fragmento GFP y 47,5  $\text{ng}/\mu\text{L}$  del fragmento *HEN4*.

## 5.2. Clonación de los fragmentos de DNA

Una vez obtenidos los fragmentos para la construcción genética, se procedió a la clonación de los mismos en el vector de destino. Tal y como se mencionó en el apartado de Antecedentes, el método de clonación empleado en este trabajo está basado en el ensamblaje de DNA, que requiere fragmentos lineales con secuencias solapantes. Estos fragmentos de DNA lineales son los obtenidos en el apartado 5.1, además del vector plasmídico pGreenII 0179 linealizado previamente mediante digestión con las enzimas de restricción *Apal* y *Sacl*. Para que puedan ensamblarse entre sí, contienen extremos solapantes que fueron añadidos gracias a los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las PCR anteriores.

Además, se requieren una serie de actividades enzimáticas que permitan la obtención final de una única molécula circular estable. Para ello, se utilizó el kit GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix (Life Technologies), que tal y como se mencionó en la sección Antecedentes (apartado 2.3), es un método rápido y sencillo, que se lleva a cabo a temperatura ambiente.

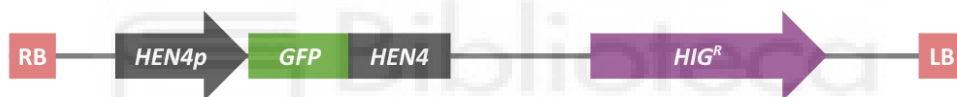
Para la clonación, se empleó una relación molar inserto:vector igual a 2,5:1. Para calcular las cantidades de inserto necesarias en nanogramos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{ng inserto} = \frac{2,5 \times \text{pb inserto} \times 50 \text{ ng vector linealizado}}{5050 \text{ pb vector linealizado}}$$

Una vez obtenido este dato, se determinó el volumen a utilizar de cada fragmento en el ensamblaje. Los volúmenes calculados se mezclaron en un tubo

ependorf y se añadió la cantidad suficiente de agua hasta alcanzar un volumen de 5  $\mu\text{L}$ . Finalmente, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de enzimas GeneArt. La combinación de los fragmentos con los reactivos, indicada a continuación, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente para obtener la construcción *HEN4p::GFP-HEN4* insertada en el T-DNA del vector pGreenII 0179 (Figura 12).

Vector pGreenII 0179 (125 ng/ $\mu\text{L}$ )....	0,4 $\mu\text{L}$ (50 ng)
<i>HEN4p</i> .....	1,2 $\mu\text{L}$ (37,92 ng)
<i>GFP</i> .....	0,4 $\mu\text{L}$ (17,96 ng)
<i>HEN4</i> .....	2,88 $\mu\text{L}$ (136,8 ng)
Agua (hasta 5 $\mu\text{L}$ ).....	0,12 $\mu\text{L}$
Mezcla de enzimas GeneArt .....	5 $\mu\text{L}$



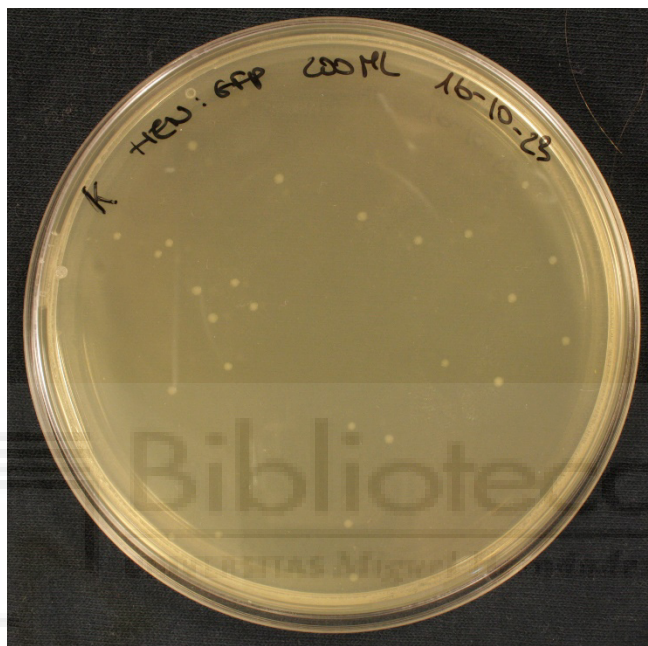
**Figura 12.- Fragmento de T-DNA con la construcción *HEN4p::GFP-HEN4* y el gen de la resistencia a la higromicina.**

### 5.3. Transformación de *Escherichia coli* y secuenciación

A continuación, se procedió a la transformación de células de *Escherichia coli* (*E. coli*) con el plásmido recombinante recién obtenido. Para ello, se añadieron 3  $\mu\text{L}$  del producto de la clonación a una alícuota de células quimiocompetentes de *E. coli*. Seguidamente, se sometieron a un choque térmico para permitir la entrada del plásmido recombinante a estas células. El choque térmico consistió en tratamientos sucesivos de las células junto con el plásmido, primero en hielo durante 30 minutos, seguido de 30 segundos a 42°C y, finalmente, en hielo durante 1 minuto y medio. Posteriormente, se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de medio LB líquido, y se incubó 1 hora a 37°C y con agitación de 150 rpm para permitir la expresión del gen de resistencia a kanamicina.



Pasado ese tiempo, se sembraron dos alícuotas de 100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l, respectivamente, en placas con LB con kanamicina, y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Al día siguiente, se pudieron observar numerosas colonias surgidas a partir de células resistentes a kanamicina que, por tanto, habían incorporado el plásmido recombinante (Figura 13).



**Figura 13.- Colonias resistentes a kanamicina y, por tanto, portadoras del plásmido recombinante con la construcción *HEN4p::GFP-HEN4*.**

---

Se realizaron cultivos líquidos en medio LB con kanamicina de dos de estas colonias (colonias 1 y 2) durante 16 horas a 37°C y 150 rpm, obteniéndose múltiples células que contenían el plásmido de interés. A partir de ellas, se procedió a la purificación del plásmido. Para ello, se utilizó el kit GenJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) tras la precipitación de las bacterias mediante centrifugación. Los plásmidos purificados (plásmidos 1 y 2) se resuspendieron en un volumen de 50  $\mu$ L de agua estéril y, finalmente, se determinaron sus concentraciones utilizando un fotómetro, obteniéndose una concentración de 279,2 ng/ $\mu$ L para el plásmido 1 y 256,8 ng/ $\mu$ L para el plásmido 2.

Para comprobar que el plásmido a emplear en las manipulaciones posteriores contenía la secuencia correcta y carecía de mutaciones, se envió una alícuota del plásmido 1 a la empresa Stab Vida. Esta empresa, situada en Portugal, ofrece un servicio de secuenciación Sanger. Tras recibir los resultados de la secuenciación, confirmamos que el plásmido obtenido contiene la secuencia correcta de la construcción *HEN4p::GFP-HEN4*.

#### **5.4. Transformación de *Agrobacterium* con el plásmido recombinante**

El siguiente paso consistió en obtener células de *Agrobacterium* transformadas con el plásmido portador de la construcción de interés. Para ello, se utilizaron células electrocompetentes con el plásmido pSOUP, que contiene los genes *vir* necesarios para la transferencia del T-DNA. A estas células, se les añadió una alícuota de 0,5 uL de la solución del plásmido (~140 ng de plásmido recombinante) y la mezcla se sometió a electroporación a 1800 V para provocar la transformación. A continuación, se añadieron 800 µL de medio de cultivo a las células y se incubaron durante 3 horas a 28°C y 150 rpm, para permitir la activación de los genes de resistencia a los antibióticos.

Pasadas esas 3 horas, se sembraron las células en placas de Petri con medio de cultivo suplementado con kanamicina y tetraciclina, para seleccionar las bacterias portadoras de los dos plásmidos, el recombinante (resistencia a kanamicina) y el pSOUP (resistencia a tetraciclina). Tras una incubación de 48 horas a 28°C, se observaron numerosas colonias resistentes a los dos antibióticos.

#### **5.5. Transformación de plantas de *Arabidopsis* con *Agrobacterium***

Las células de *Agrobacterium* portadoras de ambos plásmidos se utilizaron para generar plantas transgénicas de *Arabidopsis* portadoras de la construcción *HEN4p::GFP-HEN4*. El método utilizado fue el de *floral dipping*, que consiste en introducir inflorescencias de la planta en una solución con células de *Agrobacterium* en suspensión<sup>10</sup>.

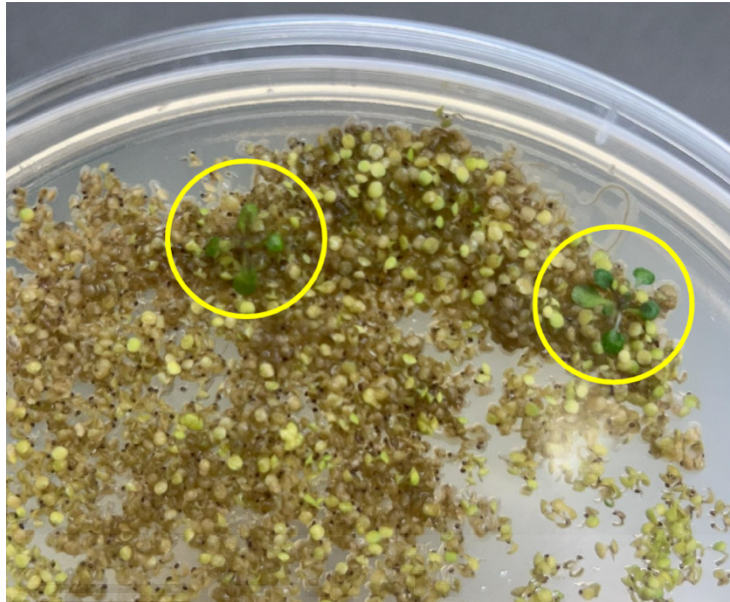
El primer paso consiste en realizar un precultivo de 5 mL en medio LB líquido con kanamicina y tetraciclina inoculado con células de *Agrobacterium* portadoras del plásmido recombinante. El precultivo se incubó 48 horas a 28°C y 150 rpm, tras lo cual se utilizó para inocular 1 L de medio líquido con los dos antibióticos. El cultivo de 1 L se incubó en las mismas condiciones anteriores durante 12-16 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm aproximada de 0,8. A continuación, se centrifugó el cultivo para aislar las células y resuspenderlas en la solución de infiltración compuesta por sacarosa al 5% y el detergente Silwet L-77 al 0,035%.

Por otro lado, 6 semanas antes de realizar la transformación de *Arabidopsis* se sembraron 16-24 plantas del ecotipo silvestre Col-0. Transcurrido este tiempo, las plantas ya habían florecido, lo que es necesario para su transformación.

Finalmente, se procedió al *floral dipping*, que consistió en sumergir los tallos de *Arabidopsis* dentro un recipiente con la solución de *Agrobacterium* durante 45"-1'. Las plantas sometidas al tratamiento se devolvieron a la cámara de cultivo, cubriéndolas durante las primeras 24 horas de incubación para aumentar la humedad. Estas plantas, denominadas generación T<sub>0</sub>, no contienen el T-DNA con la construcción *HEN4p::GFP-HEN4*, sino que éste se encontrará en algunas de sus semillas que darán lugar a las plantas de la siguiente generación (generación T<sub>1</sub>).

La eficacia de transformación es baja, con lo que fue preciso sembrar un número abundante de semillas para identificar las plantas T<sub>1</sub> que sí habían incorporado el transgén, que se pudieron distinguir de las que no lo habían hecho por su resistencia a higromicina conferida por un gen presente en el T-DNA. La siembra consistió en pesar alrededor de 100 mg de semillas (1000-1500 semillas por placa), esterilizarlas y resuspenderlas en agar al 0,1% con higromicina para su vertido de forma homogénea en placas de Petri con medio de cultivo suplementado con higromicina. Las placas tapadas se sellaron con cinta adhesiva y se colocaron en una cámara de cultivo a 21°C. Pasadas 2-3 semanas, se pudo observar una mayoría de plantas sensibles a higromicina, entre las

cuales había un total de 16 plantas T<sub>1</sub> que sí se desarrollaron y se trasplantaron a macetas para que completaran su desarrollo (Figura 14).



**Figura 14.- Resultado de la siembra de semillas T<sub>1</sub> en placas con higromicina.** Se observan 2 plantas resistentes a higromicina, debido a que contienen el T-DNA que incluye un gen de resistencia a este antibiótico (círculos amarillos).

---

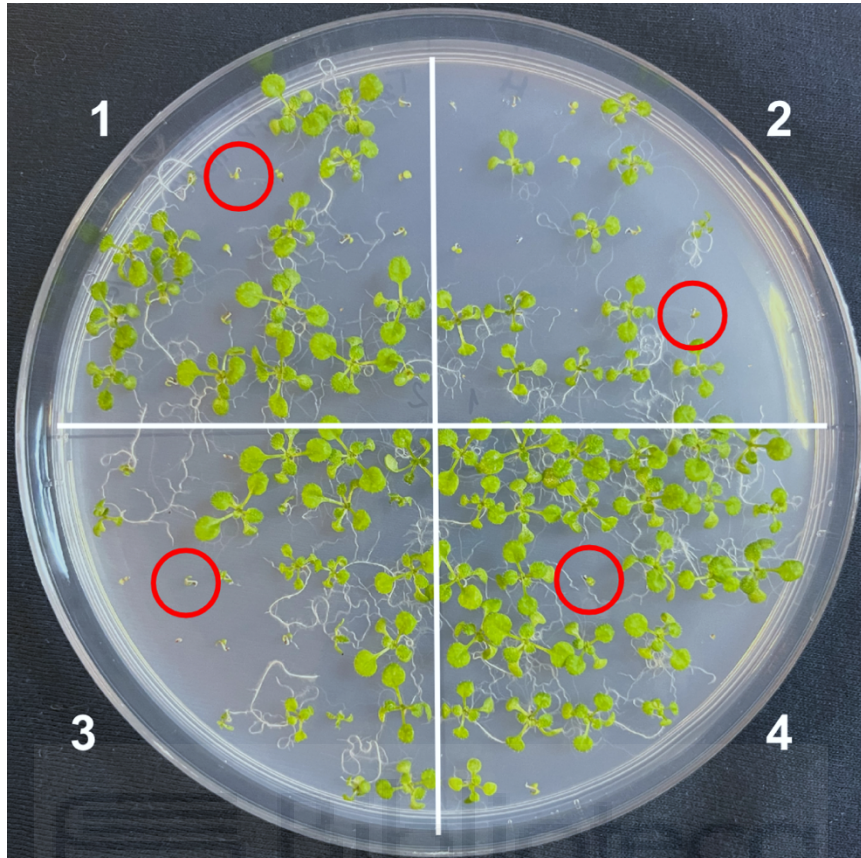
Para comprobar molecularmente que las plantas T<sub>1</sub> poseen la construcción *HEN4::GFP-HEN4*, se tomó una hoja de 4 de ellas y se obtuvo el DNA genómico. Este fue utilizado como molde para realizar una PCR que detecta específicamente la presencia de la construcción de interés, obteniéndose un resultado positivo en todas ellas (Figura 15).



**Figura 15.- Detección por PCR de la construcción *HEN4p::GFP-HEN4* en plantas de la población  $T_1$ .** Arriba: esquema de la construcción donde se indica con flechas la posición de los cebadores utilizados. Abajo: electroforesis en gel de agarosa con el resultado de la PCR. Calle 1: marcador de 100 pares de bases. Calles 2 a 5: producto de PCR de las plantas 1, 2, 3 y 4.

---

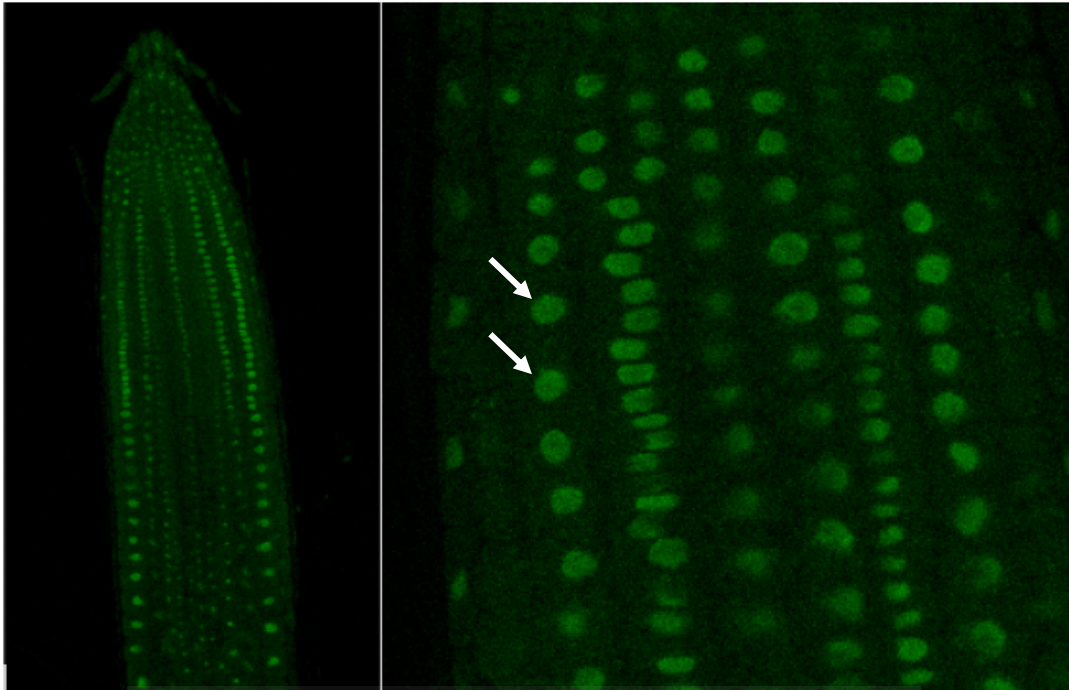
Tras la autopolinización de plantas de la  $T_1$ , obtuvimos una segunda generación de plantas transgénicas ( $T_2$ ). Se sembraron, al igual que las anteriores generaciones, en una placa de medio de cultivo suplementado con higromicina, observándose el crecimiento de plantas resistentes, así como plantas sensibles al antibiótico carentes del T-DNA con la construcción (Figura 16), siguiendo segregaciones mendelianas clásicas.



**Figura 16.- Siembra de semillas T<sub>2</sub> en higromicina (líneas 1 a 4). Se observan plantas sensibles al antibiótico (se indican algunas con círculos rojos).**

---

Para comprobar si la construcción, además de estar presente en las plantas, era funcional, se visualizaron algunas plantas T<sub>2</sub> con un microscopio confocal. *HEN4* se expresa en varios tejidos, incluida la raíz. Ésta tiene la ventaja de que no posee clorofilas, un pigmento que puede interferir con la longitud de onda de la GFP. Se pudo confirmar la presencia de la proteína de fusión en las células de este órgano, observándose una señal intensa en el núcleo (Figura 17). Esto estaría en consonancia con el hecho de que HEN4 es una proteína de unión a RNA que contribuye a la función correcta de varios genes mediante regulación cotranscripcional de la expresión génica



**Figura 17.- Raíces de una planta T<sub>2</sub> en la que se detecta la señal fluorescente generada por la construcción *HEN4p::GFP-HEN4*. Se observa una señal más intensa en los núcleos de las células. Las flechas señalan dos núcleos.**

## 6. CONCLUSIONES

1.- Se amplificaron con éxito los fragmentos necesarios (*HEN4p*, *GFP* y *HEN4*) mediante PCR a partir del DNA genómico obtenido. Los tamaños de los fragmentos amplificados coincidieron con los esperados, lo que se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los productos de PCR fueron purificados y cuantificados adecuadamente, obteniéndose concentraciones suficientes para la clonación.

2.- La clonación de los fragmentos en el vector pGreenII 0179 fue exitosa, confirmándose la correcta integración de los fragmentos mediante transformación en *Escherichia coli* y posterior secuenciación.

3.- El método de *floral dipping* permitió la generación de plantas de *Arabidopsis* transgénicas, como lo demuestran la resistencia a higromicina conferida por un gen presente en el T-DNA y la confirmación de la presencia de la construcción mediante PCR en las plantas T<sub>1</sub>.

4.- La observación mediante microscopio confocal de plantas T<sub>2</sub> reveló la señal fluorescente de la proteína de fusión con la GFP en los núcleos de las células de la raíz, indicando una expresión funcional de la construcción *HEN4p::GFP-HEN4*.

En resumen, el trabajo demuestra la viabilidad de la estrategia empleada para clonar y expresar la construcción *HEN4p::GFP-HEN4* en plantas de *Arabidopsis*, confirmando tanto la correcta integración y secuencia del transgén como su expresión funcional en las plantas transgénicas obtenidas.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Utoronto.ca.. Disponible en: [https://bar.utoronto.ca/api/efp\\_image/efp\\_arabidopsis/Klepikova Atlas/Absolute/AT5G64390](https://bar.utoronto.ca/api/efp_image/efp_arabidopsis/Klepikova Atlas/Absolute/AT5G64390)
2. Ortuño-Miquel S, Rodríguez-Cazorla E, Zavala-Gonzalez EA, Martínez-Laborda A, Vera A. Arabidopsis HUA ENHANCER 4 delays flowering by upregulating the MADS-box repressor genes FLC and MAF4. *Sci Rep.* 2019;9(1).
3. Rodríguez-Cazorla E, Ripoll JJ, Andújar A, Bailey LJ, Martínez-Laborda A, Yanofsky MF, et al. K-homology nuclear ribonucleoproteins regulate floral organ identity and determinacy in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 2015 ;11(2):e1004983.
4. Cheng Y, Kato N, Wang W, Li J, Chen X. Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1, act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in Arabidopsis thaliana. *Dev Cell [Internet].* 2003;4(1):53–66.
5. Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature.* 2000;405(6783):200–3.
6. Rodríguez-Cazorla E, Ortuño-Miquel S, Candela H, Bailey-Steinitz LJ, Yanofsky MF, Martínez-Laborda A, et al. Ovule identity mediated by pre-mRNA processing in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 2018;14(1):e1007182.
7. Rodríguez-Cazorla E, Ripoll J-J, Ortuño-Miquel S, Martínez-Laborda A, Vera A. Dissection of the Arabidopsis *HUA-PEP* gene activity reveals that ovule fate specification requires restriction of the floral A-function. *New Phytol.* 2020;227(4):1222–34.
8. The SLIC, Gibson, CPEC, and SLiCE assembly methods (and GeneArt® Seamless, In-Fusion® Cloning). Jbei.org. Disponible en: <https://j5.jbei.org/j5manual/pages/22.html>
9. Singer K. The mechanism of T-DNA integration: Some major unresolved questions. En: *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 287–317.

10. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1998;16(6):735–43.

