



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

TRABAJO FIN DE GRADO

# **CARACTERIZACIÓN DE SENSORES FLUORESCENTES PARA DETECTAR LA ACTIVIDAD DEL MICRORNA172 EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO 2020/2021

AUTOR:

**JULIÁN VALERA MANZANARES**

DIRECTOR CIENTÍFICO:

**Dr. VICENTE BALANZÀ PÉREZ Y  
Dra. CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE**

TUTOR ACADÉMICO:

**MARÍA PILAR LÓPEZ GRESA**

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL  
MEDIO NATURAL

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MOLECULAR DEL DESARROLLO DE  
CARPELOS Y FRUTOS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
VALENCIA, JULIO 2021

# CARACTERIZACIÓN DE SENSORES FLUORESCENTES PARA DETECTAR LA ACTIVIDAD DEL MICRORNA172 EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Autor: D. Julián Valera Manzanares

Tutor Académico: Dña. María Pilar López Gresa

Directores científicos: D. Vicente Balanzà Pérez y Dña. Cristina Ferrándiz Maestre

Valencia, Julio de 2021

## RESUMEN

Los microRNA (miRNA) son secuencias cortas de 21 nucleótidos que actúan como reguladores de la expresión de sus genes diana en los organismos eucariotas. Estos miRNA reconocen secuencias complementarias en los RNA mensajeros (mRNA) de sus dianas. En plantas, los miRNA regulan la expresión de sus dianas a dos niveles. Los miRNA pueden dirigir la degradación de sus mRNA dianas través de una escisión inicial en el sitio de reconocimiento presente en ellos, o también, impedir la traducción del mRNA diana a través de un mecanismo que todavía no está muy bien descrito en plantas. Para la gran mayoría de dianas de miRNA se ha observado que los dos mecanismos coexisten, y que, para algunas dianas en concreto, la inhibición de la traducción juega un papel principal. Este es el caso del miR172 que regula un grupo de factores de transcripción de la familia AP2 y que están implicados en múltiples procesos de desarrollo en plantas.

En el grupo donde se va a realizar este TFG estudian los mecanismos a través de los cuales se controla el final de la floración, un proceso que tiene claras implicaciones en el rendimiento de muchas especies de interés agronómico: el retraso temporal del final de la floración supone un incremento en el número de flores, frutos y semillas, que incrementa la producción final. En el control del final de la floración juegan un papel clave las proteínas AP2s, y la regulación ejercida por el miR172 sobre estos genes.

El objetivo de este TFG es testar y caracterizar diferentes sensores de la actividad del miR172 que permitan evaluar su presencia y, por lo tanto, la acumulación de sus dianas en los tejidos donde ejercen su función. Estos sensores se testarán inicialmente mediante expresión transitoria en *A. thaliana* y *Nicotiana benthamiana*, y posteriormente se generarán plantas transgénicas de *A. thaliana* y se analizará su eficacia por microscopía confocal.

**Palabras clave:** miRNA, *Arabidopsis thaliana*, sensor, microscopía confocal, expresión transitoria.

## ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are short sequences of 21 nucleotides that act as regulators of the expression of their target genes in eukaryotic organisms. These miRNAs recognize complementary sequences in the messenger RNAs (mRNAs) of their targets. In plants, miRNAs regulate the expression of their targets at two levels. The miRNAs can either direct the degradation of their target mRNAs through an initial cleavage in the recognition site present in them, or prevent the translation of the target mRNA through a mechanism that is not yet well described in plants. For the vast majority of miRNA targets, it has been observed that the two mechanisms coexist, and for some specific targets, inhibition of translation plays a major role. This is the case of miR172 that regulates a group of transcription factors of the AP2 family and that are involved in multiple development processes in plants.

In the group where this project is going to be carried out, they study the mechanisms through which the end of flowering is controlled, a process that has clear implications in the performance of many species of agronomic interest: the temporary delay of the end of flowering. It supposes an increase in the number of flowers, fruits and seeds, which increases the final production. AP2s proteins play a key role in the control of the end of flowering, and the regulation exerted by miR172 on these genes.

The objective of this project is to test and characterize different sensors of miR172 activity that allow evaluating its presence and therefore, the accumulation of its targets in the tissues where they perform their function. These sensors will be initially tested by transient expression in *A. thaliana* and *Nicotiana benthamiana*, and later transgenic *A. thaliana* plants will be generated and their effectiveness will be analyzed by confocal microscopy.

**Keywords:** miRNA, Arabidopsis thaliana, sensor, confocal microscopy, transient expression.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer al laboratorio de la Dra. Ferrándiz por haberme acogido y acompañado en el desarrollo de este proyecto. Especialmente, me gustaría mencionar a mi tutor experimental, Vicente Balanzà y a “Majo” por haber hecho mi estancia en el laboratorio tanto didáctica como autónoma.

Por último, me gustaría dar las gracias a mi familia y amigos por apoyarme y escucharme siempre a lo largo de estos cuatro años de carrera. Soy quien soy gracias a vosotros.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. MERISTEMOS Y GPA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. FAMILIA AP2</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3. PROCESAMIENTO DEL MIRNA</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL MIRNA172 EN A. THALIANA</b> .....	<b>7</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1. MEDIOS EMPLEADOS</b> .....	<b>11</b>
3.1.1. MEDIO DE CULTIVO.....	11
3.1.2. MEDIO DE INFILTRACIÓN.....	11
3.1.3. MEDIO AB-MES .....	11
3.1.4. MEDIO DE INFECCIÓN .....	11
<b>3.2. CONDICIONES DE CULTIVO</b> .....	<b>11</b>
3.2.1. MICROORGANISMOS .....	11
3.2.2. MATERIAL VEGETAL.....	12
<b>3.3. PLÁSMIDOS EMPLEADOS</b> .....	<b>12</b>
3.3.1. SENSORES MIRNA .....	12
3.3.2. SENSOR UBQ-RUBY.....	14
<b>3.4. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE E. COLI Y A. TUMEFACIENS</b> ....	<b>14</b>
<b>3.5. VALIDACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES</b> .....	<b>14</b>
<b>3.6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.7. TRANSFORMACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS</b> .....	<b>15</b>
3.7.1. ELECTROPORACIÓN .....	15
3.7.2. CHOQUE TÉRMICO .....	16
<b>3.8. TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA MEDIADA POR AGROBACTERIUM</b> ...	<b>16</b>
3.8.1. <i>N. BENTHAMIANA</i> .....	16
3.8.2. <i>A. THALIANA</i> .....	16
<b>3.9. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL</b> .....	<b>16</b>
<b>3.10. AMPLIFICACIÓN POR PCR</b> .....	<b>17</b>
<b>3.11. DIGESTIÓN DE DNA PLASMÍDICO</b> .....	<b>18</b>
<b>3.12. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA</b> .....	<b>18</b>
<b>3.13. CLONAJE IN-FUSION</b> .....	<b>18</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1. CARACTERIZACIÓN DE SENSORES FLUORESCENTES PARA EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS DISTINTOS MIRNA172 SOBRE AP2 EN NICOTIANA BENTHAMIANA</b> .....	<b>19</b>

<b>4.2. CARACTERIZACIÓN DE SENSORES FLUORESCENTES PARA EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS DISTINTOS MIRNA172 SOBRE AP2 EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3. GENERACIÓN DE UN NUEVO SENSOR PARA EL ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL MIRNA172 SOBRE AP2 .....</b>	<b>26</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....</b>	<b>29</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>30</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Representación gráfica del SAM en <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> Se muestra en color rojo la expresión de WUS y en azul y verde la expresión de CLV3 y CLV1 respectivamente. Ambos localizados en el CO (Bosca <i>et al.</i> , 2001).....	2
<b>Figura 2. Modelo para la acción AP2 en el nicho de células madre del SAM</b> (Wüirschum <i>et al.</i> , 2006).....	3
<b>Figura 3. Modelo propuesto para la regulación genética temporal del GPA</b> (Balanzà <i>et al.</i> , 2018).....	3
<b>Figura 4. Objetivos miRNA172 de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> La barra gris representa la región codificante de los objetivos miRNA, con las posiciones de los dos dominios AP2 representadas por las barras negras y los sitios miRNA172 indicados por la barra rayada (Zhu y Helliwell, 2011).....	4
<b>Figura 5. Esquema de la biogénesis de miRNA en plantas</b> (Ding <i>et al.</i> , 2012).....	5
<b>Figura 6. Representación gráfica de la vía de descomposición del mRNA mediada por miRNA en plantas</b> (Iwakawa and Tomari, 2015).....	6
<b>Figura 7. Representación gráfica de las diferentes proteínas efectoras implicadas en la vía de represión traduccional mediada por miRNA en plantas</b> (Iwakawa and Tomari, 2015).....	6
<b>Figura 8. Representación gráfica de la vía represión traduccional mediada por el complejo AGO1-RISC</b> (Iwakawa and Tomari, 2015).....	7
<b>Figura 9. Funciones reguladoras conservadas entre miRNA156 y miRNA172 en el cambio de fase de desarrollo en <i>Arabidopsis thaliana</i></b> (Zhu y Helliwell, 2011).....	8
<b>Figura 10. Secuencias nucleotídicas de las diferentes formas maduras de miRNA172 en <i>Arabidopsis</i></b> (Zhu y Helliwell, 2011).....	8
<b>Figura 11. Patrones de expresión de la familia de genes MIR172 en el ápice del brote</b> (Ó'Maoiléidigh <i>et al.</i> , 2021).....	9
<b>Figura 12. Representación esquemática de la construcción p35S::dsRED-p35S::YFP(m3/ap2).</b> Constituido por la secuencia de la proteína DsRed y la secuencia de la proteína YFP que posee (AP2) o no (m3) el sitio de unión del miRNA172 de AP2. Ambos módulos dirigidos de manera independiente por el promotor constitutivo 35S.....	12
<b>Figura 13. Representación esquemática de la construcción p35S::miRNA(A-E)-p35S::dsRED-p35S::YFP(m3/ap2).</b> Constituido por la secuencia de la proteína DsRed y la secuencia de la proteína YFP que posee (AP2) o no (m3) el sitio de unión del miRNA172 de AP2, ambos dirigidos por el promotor 35S. Además, este cuenta con un tercer módulo de expresión dirigido por el promotor 35S, constituido por la secuencia de cada miembro miRNA172.....	13
<b>Figura 14. Representación esquemática del plásmido UBQ-RUBY.</b> Constituido por un solo marco de lectura abierto (RUBY) donde se incluyen las regiones codificantes de CYP76AD1, DODA y Glucosyltransferase (necesarias para la síntesis de betalaína). Los tres genes se encuentran unidos por secuencias que codifican péptidos 2A, que permiten la expresión de múltiples proteínas bajo el control de un solo promotor (He <i>et al.</i> , 2020).....	14
<b>Figura 15. Análisis de fluorescencia de núcleos celulares de <i>Nicotiana benthamiana</i> a día 3 de la infiltración.</b> Se analizaron las intensidades de las proteínas fluorescentes YFP y DsRed por separado y el	

ratio YFP/DsRed para cada ensayo mediante el programa *Fiji*. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal a 20X, con un láser de excitación de 514 nm.....20

**Figura 16. Diagrama de barras representando los ratios de fluorescencia YFP/DsRed de los núcleos transformados de *Nicotiana benthamiana* y su desviación estándar (barras de error).** Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).....21

**Figura 17. Diagrama de barras mostrando el valor de intensidades promedio (YFP en verde, DsRed en rojo) de cada sensor analizado en *Nicotiana benthamiana* y su desviación estándar (barras de error).** Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).....22

**Figura 18. Diagrama de barras representando los ratios de fluorescencia YFP/DsRed de los núcleos transformados de *Nicotiana benthamiana* y su desviación estándar (barras de error).** Por un lado, los ratios de los sensores AP2 y m3 del gráfico anterior y por otro lado, los correspondientes a los ratios obtenidos tras la infiltración de los sensores AP2 y m3 junto con *Agrobacterium* transformadas con el plásmido que contiene la secuencia de la proteína p19. Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).....23

**Figura 19. Diagrama de barras mostrando el valor de intensidades promedio (YFP en verde, DsRed en rojo) de los sensores AP2/AP2+p19 y los sensores m3/m3+p19 en *Nicotiana benthamiana* y su desviación estándar (barras de error).** Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).....23

**Figura 20. Análisis de fluorescencia de núcleos celulares de *Arabidopsis thaliana* a día 4 de la infiltración.** Se analizaron las intensidades de las proteínas fluorescentes YFP y DsRed por separado y el ratio YFP/DsRed para cada ensayo mediante el programa *Fiji*. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal a 20X, con un láser de excitación de 514 nm.....25

**Figura 21. Diagrama de barras representando los ratios de fluorescencia YFP/DsRed de los núcleos transformados de *Arabidopsis thaliana* y su desviación estándar (barras de error).** Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).....25

**Figura 22. Diagrama de barras mostrando el valor de intensidades promedio (YFP en verde, DsRed en rojo) de cada sensor analizado en *Arabidopsis thaliana* y su desviación estándar (barras de error).** Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).....26

**Figura 23. Construcciones generadas con la tecnología *In-fusion*.** Aparecen representadas las diferentes construcciones obtenidas por la combinación de los diferentes módulos: promotor (UBQ/RPS5A), DODA/DODA<sup>172</sup> y GT/GT<sup>172</sup>. El gen CYP76AD1 no aparece representado al encontrarse en todas las construcciones.....27

**Figura 24. Reconstrucción de la vía de biosíntesis de betalaína bajo el promotor UBQ en *Arabidopsis*.** A la izquierda, *Arabidopsis* silvestre. A la derecha, *Arabidopsis* transformada con la construcción UBQ:RUBY(He *et al.*, 2020).....28



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Antibióticos empleados para la selección de los diferentes microorganismos transformados en medio LB.....	12
<b>Tabla 2.</b> Lista de enzimas de restricción utilizadas para validar por digestión las construcciones generadas y de partida.....	15
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos empleados y métodos de transformación.....	15
<b>Tabla 4.</b> Cebadores empleados para la obtención de los diferentes insertos del clonaje <i>In-Fusion</i> .....	17
<b>Tabla 5.</b> Pareja de enzimas de restricción empleadas para la linealización del vector.....	18

## ABREVIATURAS

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>miRNA/MIR</b>	Micro-RNA
<b>SAM</b>	Meristemo apical del brote
<b>WUS</b>	WUSCHEL
<b>CLV</b>	CLAVATA
<b>CO</b>	Centro Organizador
<b>GPA</b>	Parada Global de la Proliferación
<b>AP1/AP2</b>	APETALA1/2
<b>FUL</b>	FRUITFULL
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>TF</b>	Factores de transcripción
<b>TOE1/2/3</b>	TARGET OF EAT1/2/3
<b>SNZ</b>	SCHNARCHZAPFEN
<b>SMZ</b>	SCHLAFMÜTZE
<b>pri-miRNA</b>	Precursor miRNA
<b>HST</b>	HASTY
<b>AGO</b>	ARGONAUTE
<b>RISC</b>	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
<b>KTN</b>	KATANIN
<b>VCS</b>	VARICOSE
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>AMP1</b>	PROGRAMA DE MERISTEMOS ALTERADOS I
<b>LAMP1</b>	LIKE AMP1
<b>SPL</b>	SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>L</b>	Litro
<b>g</b>	Gramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>m/v</b>	Masa/Volumen
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>min</b>	Minutos
<b>MS</b>	Murashige-Skoog
<b>M</b>	Molar
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>AS</b>	Acetosiringona
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μg</b>	Microgramo
<b>p/v</b>	Peso/Volumen
<b>kb</b>	Kilobase
<b>h</b>	Hora
<b>cm</b>	Centímetro
<b>s</b>	Segundo
<b>OD<sub>600</sub></b>	Densidad Óptica a 600 nanómetros
<b>YFP</b>	Yellow fluorescent protein
<b>DsRed</b>	Red fluorescent protein
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>dNTP</b>	Deoxinucleósido trifosfato

<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>VSRS</b>	Supresor viral de silenciamiento de RNA
<b>UBQ</b>	Ubiquitina (promotor)
<b>DODA</b>	L-DOPA 4,5-dioxigenasa
<b>GT</b>	Glicosiltransferasa
<b>RPS5A</b>	Proteína ribosómica S5A (promotor)
<b>tasiRNA</b>	ARN interferente pequeño que actúa en trans

# 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas, debido a su condición sésil, han desarrollado multitud de mecanismos para poder adaptarse y sobrevivir en condiciones cambiantes. Una de las adaptaciones que más ventajas ha reportado a las plantas es el desarrollo de los frutos.

En este sentido, tanto las plantas gimnospermas como angiospermas producen semillas. Sin embargo, son estas últimas (plantas con flor) las que protegen sus óvulos y semillas en el interior del carpelo. Esta forma de reproducción es considerada la innovación que explica su éxito reproductivo (*Stebbins et al., 1970*).

En el reino vegetal encontramos dos estrategias reproductivas: semelparidad e iteroparidad. Mientras que las plantas semélparas o monocárpicas dedican la mayor parte de su energía y recursos a maximizar el número de semillas en un solo ciclo de reproducción y mueren poco después de reproducirse, las plantas iteróparas o policárpicas se reproducen varias veces a lo largo de su vida (*Amasino, 2009*).

La forma de reproducción de las plantas angiospermas, es decir, la producción de semillas y frutos, tiene una importancia clave a nivel económico en el sector agrícola. Por tanto, el estudio cada vez más profundo de los mecanismos que controlan estos procesos será fundamental para el desarrollo de una agricultura cada vez más eficiente.

Este proyecto, desarrollado en el grupo de genética molecular del desarrollo de carpelos y frutos del IBMCP (centro mixto UPV-CSIC) y dirigido por la Doctora Ferrándiz, trata de caracterizar una serie de herramientas para el estudio y esclarecimiento de las redes genéticas que controlan el mantenimiento de los meristemos reproductivos, así como otros aspectos del crecimiento y desarrollo de los organismos modelo empleados: *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*, ambas plantas Angiospermas.

Concretamente, el estudio del papel del miRNA172 podría proporcionar nuevas formas de manipular y optimizar los procesos de desarrollo como el crecimiento y la estatura de las plantas, la floración, la formación de semillas y el rendimiento para mejorar la productividad de los cultivos (*Zhu & Helliwell, 2011; Spanudakis y Jackson, 2014*).

La similitud en el desarrollo básico de los organismos *N. benthamiana* y *A. thaliana* con respecto al resto de angiospermas permitiría la extrapolación de los resultados y conclusiones inferidas en este proyecto a cultivos de gran importancia económica.

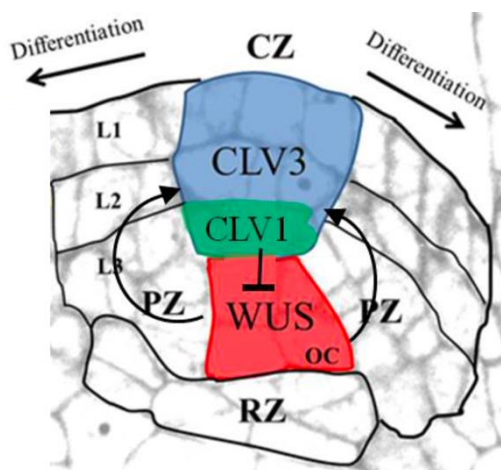
## 1.1. MERISTEMOS Y GPA

A diferencia de los animales, el desarrollo en plantas es continuado. Las plantas se desarrollan a partir de regiones de células madre denominadas meristemos, establecidos al inicio del desarrollo con la formación del embrión. Concretamente, las angiospermas generan dos tipos de meristemos apicales: el meristemo apical del tallo (SAM) encargado de la producción de células que se diferencian en tallos, hojas y flores (estructuras aéreas); y el meristemo apical de la raíz (RAM).

El SAM se puede definir desde un punto de vista estructural y funcional (Figura 1). En cuanto a su estructura, este está organizado en varias capas clonales: L1, que se corresponde con las células de la epidermis, y L2 y L3 con células subepidérmicas. Bajo el punto de vista funcional, se compone de distintas regiones: una zona central (CZ), donde se localizan las células madre con una baja tasa de división celular; una zona periférica (PZ), donde sí que tiene lugar una rápida división celular para la formación de todas las estructuras aéreas de la planta; y por último, una zona medular (RZ) (*Steeves et al., 1989; Medford et al., 1992*).

Desde un punto de vista molecular, el control genético al que está sometido el SAM viene dado por los genes WUSCHEL (WUS) y CLAVATA (CLV1 y 3), que forman un bucle de retroalimentación negativo en la zona conocida como Centro Organizador (CO), regulando el mantenimiento de las células madre del SAM.

El gen WUS, regulado a la baja por la vía CLV, codifica para un factor de transcripción esencial para el mantenimiento de la reserva de células madre (Laux *et al.*, 1996). Mientras que CLV1 y 3, regulado al alza por WUS, actúan juntos en una vía de transducción de señales que restringe el destino de las células madre (Schoof *et al.*, 2000).



**Figura 1. Representación gráfica del SAM en *Arabidopsis thaliana*.** Se muestra en color rojo la expresión de WUS y en azul y verde la expresión de CLV3 y CLV1 respectivamente. Ambos localizados en el CO (Boscá *et al.*, 2001).

La homeostasis entre el *pool* de células madre del meristemo y las células hijas diferenciadas es vital para la continua formación de los nuevos órganos (Brand *et al.*, 2002).

A grandes rasgos, en plantas monocárpicas (como es el caso de *Arabidopsis*), la actividad del SAM es continuada. Durante la fase vegetativa de la planta genera tallos y hojas, pero tras la transición floral, el meristemo se encarga del desarrollo de las estructuras florales (Mayer *et al.*, 1998; Williams y Fletcher, 2005). Tras la generación de un número determinado de flores, tiene lugar un fenómeno conocido como Parada Global de la Proliferación o GPA (Global Proliferative Arrest), que establece el final del ciclo vital en las plantas monocárpicas.

El GPA se pone de manifiesto con la detención de la actividad de todos los meristemos aéreos activos de la planta, que ocurre de forma coordinada y en un corto periodo de tiempo.

Las flores formadas o las que ya han sido polinizadas continúan con el desarrollo de los frutos y semillas, mientras que las flores jóvenes senescen. Tras completarse el desarrollo de estas últimas semillas, la planta entra en un proceso senescente que termina con la muerte de la planta como una estrategia para optimizar la asignación de recursos (Balanžà *et al.*, 2018).

Mientras que se han llevado a cabo múltiples estudios sobre el control genético involucrado en el mantenimiento de las células madre del SAM, se sabe poco sobre los mecanismos genéticos y moleculares que controlan el tiempo de GPA.

Aunque la señalización de los frutos en desarrollo es uno de los principales factores que controla la detención del meristemo, también se ha propuesto que una vía dependiente de la edad controle el tiempo de GPA (Hensel *et al.*, 1994).

En este sentido, la primera ruta génica involucrada en el control del GPA en *Arabidopsis thaliana* fue descubierta en este laboratorio, señalando la importancia del papel que desempeñan los factores de transcripción APETALA2 (AP2) y FRUITFULL (FUL) (Balanžà *et al.*, 2018; Martínez-Fernández *et al.*, 2020).

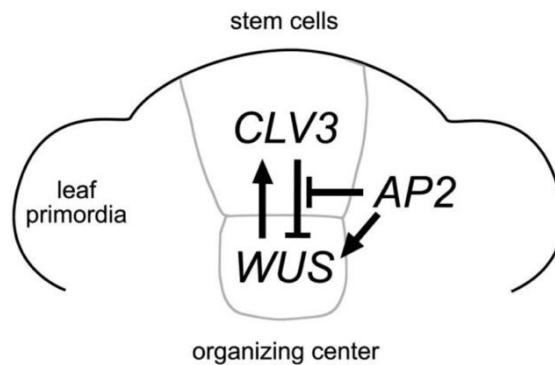
## 1.2. FAMILIA AP2

Los factores de transcripción de la familia AP2 están implicados en múltiples procesos de desarrollo, desde la transición floral hasta el desarrollo de la semilla.

La planta modelo *Arabidopsis* cuenta con 6 miembros de esta familia: APETALA2 (AP2), TARGET OF EAT1 (TOE1), TOE2, TOE3, SCHNARCHZAPFEN (SNZ) y SCHLAFMÜTZE (SMZ) (Ó'Maoiléidigh et al., 2021).

Aunque algunos de ellos pueden tener funciones específicas, existe cierto grado de redundancia entre ellos (Jung et al., 2007 y Mathieu et al., 2009).

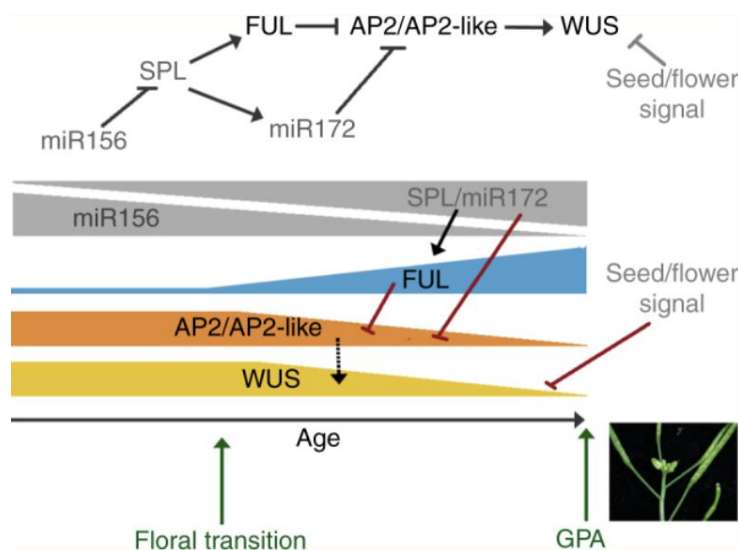
AP2 fue identificado previamente como regulador positivo de WUS, afectando al mantenimiento de las células madre del meristemo al intervenir en el ciclo de realimentación WUS-CLV3 (Figura 2) (Würschum et al., 2006).



**Figura 2. Modelo para la acción AP2 en el nicho de células madre del SAM (Würschum et al., 2006).**

El modelo propuesto por Balanzà et al. (2018) (Figura 3), muestra una regulación directa tanto de FUL como del miRNA172 sobre AP2, sugiriendo que los niveles de WUS en SAM dependen en gran parte de la actividad de los genes AP2.

Este mecanismo paralelo de represión tanto transcripcional (por parte de FUL) como postranscripcional (por parte de miRNA172) proporciona una forma rápida y robusta de represión de la actividad AP2, que a su vez regula la actividad del meristemo y, por tanto, la parada global de la proliferación.



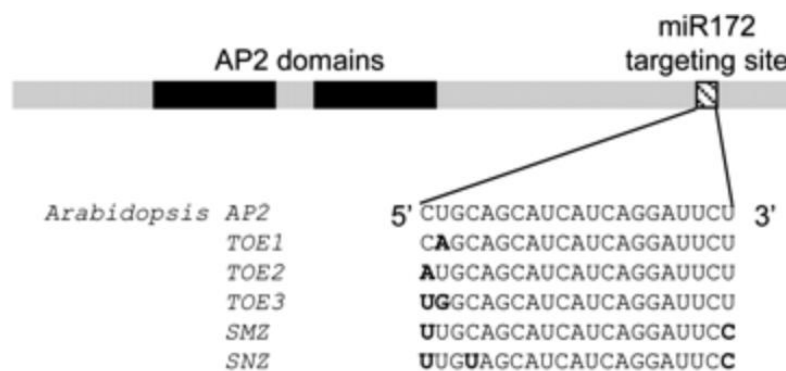
**Figura 3. Modelo propuesto para la regulación genética temporal del GPA (Balanzà et al., 2018).**

Los miembros de esta familia AP2-LIKE son las dianas principales de los miRNA172. Estos ejercen su regulación a través de la escisión de sus transcritos, la inhibición de la traducción o a través de una combinación de ambos.

En el caso del miRNA172, domina la ruta de represión traduccional sobre la de escisión del RNA (Aukerman y Sakai, 2004).

Se ha propuesto que tanto la cantidad de miRNA en relación con sus dianas, como el grado de complementariedad entre miRNA y sus objetivos, y también la regulación por retroalimentación de la expresión génica, contribuye a determinar el predominio en el modo de regulación adoptado (Zhu y Helliwell, 2011).

Los sitios de unión de miRNA172 de estos genes (Figura 4) se encuentran dentro de sus regiones codificantes cerca del extremo 3', pero fuera de los dominios AP2 conservados (Chen X., 2004). Además, miRNA172 comparte una complementariedad casi perfecta con su objetivo, conteniendo solo dos desajustes con AP2 (19 de 21 nucleótidos) (Aukerman y Sakai, 2004).

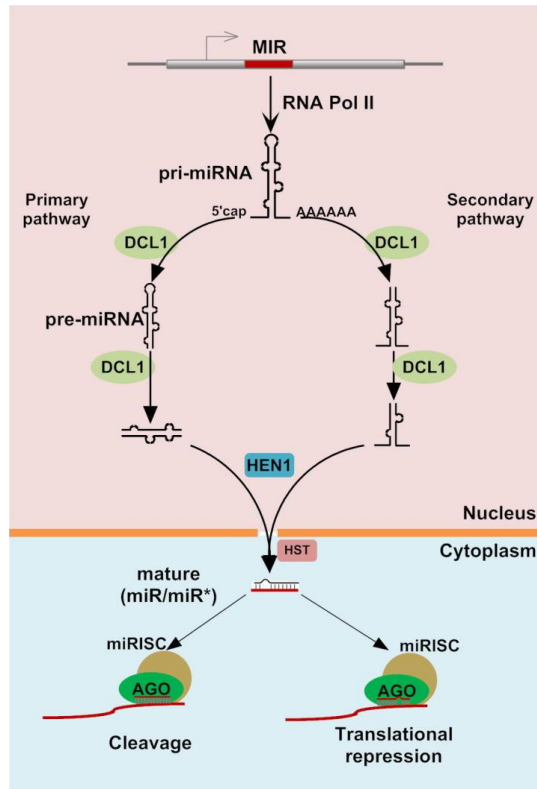


**Figura 4. Objetivos miRNA172 de Arabidopsis thaliana.** La barra gris representa la región codificante de los objetivos miRNA, con las posiciones de los dos dominios AP2 representadas por las barras negras y los sitios miRNA172 indicados por la barra rayada (Zhu y Helliwell, 2011).

### 1.3. PROCESAMIENTO DEL MIRNA

Los microRNA (miRNA) son RNA no codificantes de 21 nucleótidos de longitud identificados tanto en plantas como en animales (Aukerman y Sakai, 2004) implicados en casi todos los aspectos del crecimiento, desarrollo y adaptación al estrés de las plantas (Spanudakis y Jackson, 2014).

Están codificados por genes MIR, localizados principalmente en regiones intergénicas del genoma en el caso de Arabidopsis (Voinnet, 2009). Su longitud es muy variable pero la mayoría están regulados por una caja TATA conservada (Xie et al., 2005).



**Figura 5. Esquema de la biogénesis de miRNA en plantas (Ding et al., 2012).**

El primer paso en el proceso de biogénesis de miRNA tiene lugar en el núcleo con la transcripción de un gen MIR por la ARN polimerasa II (Guleria et al., 2011).

El miRNA primario (pri-miRNA) obtenido, que contiene una cap 5' y una cola de poli-A 3' para eliminar los intrones (Xie et al., 2005), tiene la capacidad de formar estructuras en horquilla estables (Aukerman y Sakai, 2004).

Existen dos vías de procesamiento de precursores de miRNA en plantas (Figura 5).

La vía principal implica el procesamiento de la horquilla de pri-miRNA en la que la secuencia y la estructura más allá del dúplex de miRNA son necesarias y utilizadas por los componentes de la vía de escisión para eliminar las secuencias maduras (Song et al., 2010).

Otra vía implica el procesamiento del precursor en el que solo la estructura del dúplex es necesaria para que los componentes de la vía de escisión eliminen las secuencias maduras (Bologna et al., 2009).

Se cree que HASTY (HST) se encarga de exportar el dúplex al citoplasma (Hutvagner et al., 2008). Una vez en el citoplasma, el dúplex de miRNA se disocia en la hebra guía y la hebra pasajera mediante la acción de helicasas desconocidas.

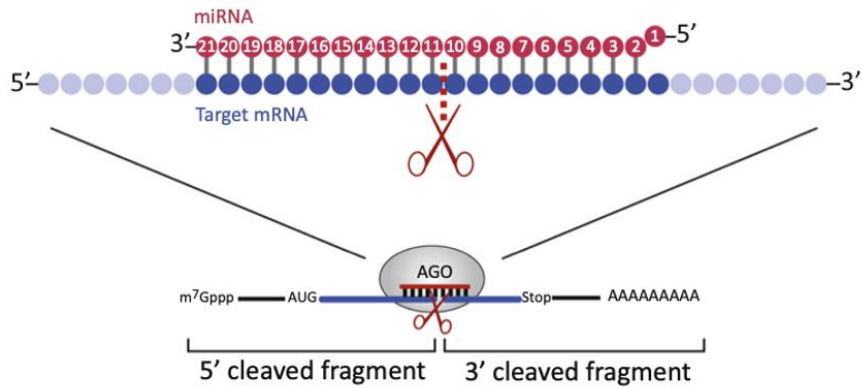
Los miRNA maduros resultantes necesitan formar un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) para silenciar sus mRNA diana. Este complejo está compuesto por un pequeño RNA y una proteína Argonauta (AGO).

A través de RISC, los miRNA median dos modos de silenciamiento génico: la desintegración del mRNA y la represión de la traducción (Kawamata and Tomari, 2010; Wilson and Doudna, 2013).

Cuando el miRNA tiene una complementariedad perfecta o casi perfecta con el mRNA, el complejo AGO1-RISC escinde el mRNA diana en la posición de los nucleótidos 10 y 11 de los



miRNA (Figura 6) (Ameres and Zamore, 2013). En *Arabidopsis*, los fragmentos escindidos son degradados por la endorribonucleasa XRN4 (Souret et al., 2004).

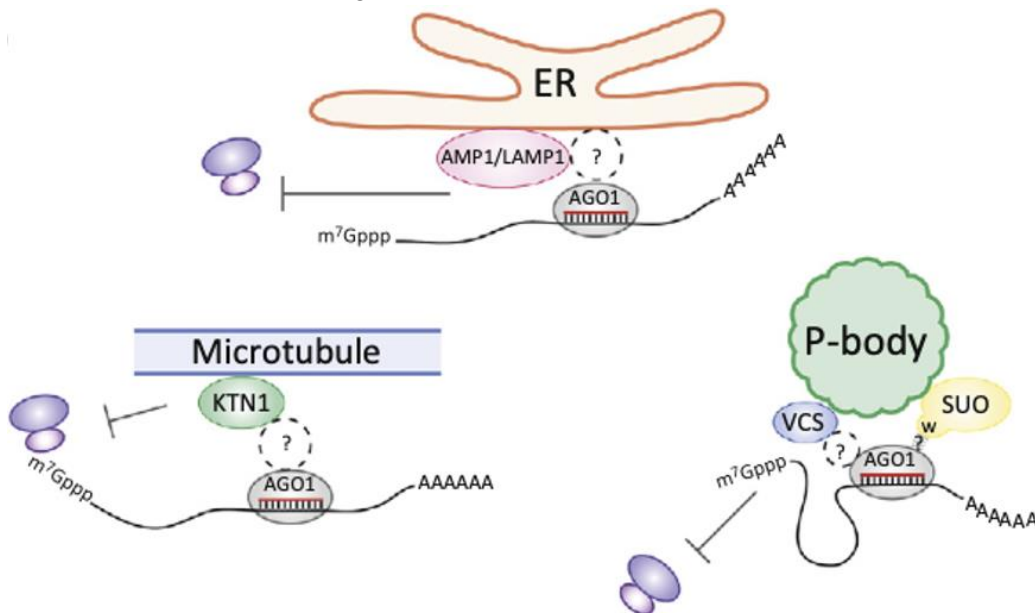


**Figura 6. Representación gráfica de la vía de descomposición del mRNA mediada por miRNA en plantas** (Iwakawa and Tomari, 2015).

Los miRNA también inducen la represión traduccional en plantas, pero su mecanismo no se conoce del todo. En 2008, Brodersen et al. proporcionó la primera evidencia de represión traduccional mediada por miRNA en plantas, reflejando la implicación de la enzima cortadora de microtúbulos KATANIN (KTN1) en este proceso.

Desde ese momento, se han identificado nuevos factores (Figura 7) cuya mutación causa la desrepresión de los genes diana de miRNA a nivel de proteína, como AGO1, AGO10, las proteínas localizadas en los cuerpos P (VCS y SUO) y las proteínas integrales de membrana asociadas al RE (AMP1 y LAMP1) (Brodersen et al., 2008; Yang et al., 2012; Li et al., 2013).

Debido al gran número de factores implicados, se infiere que son muchos los procesos celulares dinámicos que pueden participar en la represión traduccional mediada por miRNA. Sin embargo, su rol molecular e interrelación siguen sin estar claros.

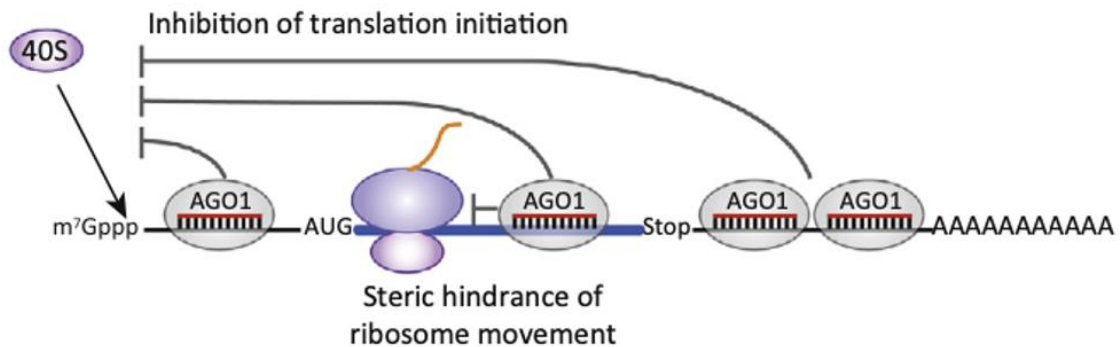


**Figura 7. Representación gráfica de las diferentes proteínas efectoras implicadas en la vía de represión traduccional mediada por miRNA en plantas** (Iwakawa and Tomari, 2015).

En esta línea, y puesto que la densidad ribosómica disminuye por los miRNA específicamente en el RE, se ha propuesto un mecanismo en el que los miRNA inhiban el inicio de la traducción secuestrando el mRNA diana.

Por otro lado, una cantidad significativa de miRNA asociada con el polisoma implica la acción de los miRNA de plantas en un paso posterior a la iniciación.

Volviendo al complejo AGO1-RISC, un estudio basado en un sistema sin células vegetales mostró su implicación en la represión del inicio de la traducción del miRNA diana mediante el bloqueo del movimiento de los ribosomas (Figura 8). Sin embargo, esta vía necesita múltiples sitios diana para una represión eficiente (Iwakawa and Tomari, 2015).



**Figura 8. Representación gráfica de la vía represión traduccional mediada por el complejo AGO1-RISC (Iwakawa and Tomari, 2015).**

Normalmente, el apareamiento casi perfecto de los miRNA vegetales con sus dianas desencadena una rápida escisión endonucleolítica. Sin embargo, en el caso de miRNA172, domina la ruta de represión traduccional sobre la de escisión del RNA (Aukerman y Sakai, 2004).

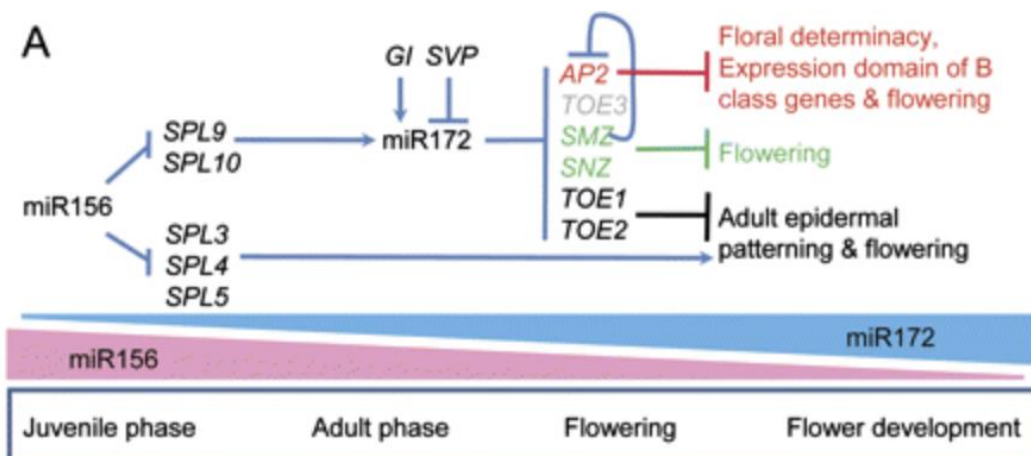
Actualmente, no está claro cómo los mRNA diana reprimidos traduccionalmente evaden la escisión endonucleolítica por AGO1-RISC (Iwakawa and Tomari, 2015).

#### 1.4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL MIRNA172 EN *A. THALIANA*

El miRNA156 presenta un patrón de expresión complementario al del miRNA172. Esto se debe a que los miRNA156 regulan negativamente los niveles de los genes SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL), activadores de la expresión del miRNA172.

En *Arabidopsis*, los niveles de miRNA156 disminuyen con la edad de la planta, por lo que la expresión de los genes SPL aumenta a medida que las plantas envejecen (Fornara et al., 2010). Esto provoca la activación de miRNA172 encargado de promover la identidad de la fase adulta a través de la represión de sus objetivos TOE1 y TOE2 (Wu et al., 2009) hasta la fase reproductiva.

Las cascada miRNA156-SPL9-miRNA172-TOE1/TOE2 comprende componentes importantes en la vía del envejecimiento (Wang et al., 2009), ya que además de un papel en la transición de juvenil a adulto, contribuye a la transición de la fase adulta a la fase reproductiva en *Arabidopsis* (Zhu y Helliwell, 2011).



**Figura 9. Funciones reguladoras conservadas entre miRNA156 y miRNA172 en el cambio de fase de desarrollo en *Arabidopsis thaliana* (Zhu y Helliwell, 2011).**

El miRNA172 en *Arabidopsis* está representado por 5 genes (miRNA172A-E), que codifican para 3 formas maduras que difieren en la primera o última base de su secuencia.

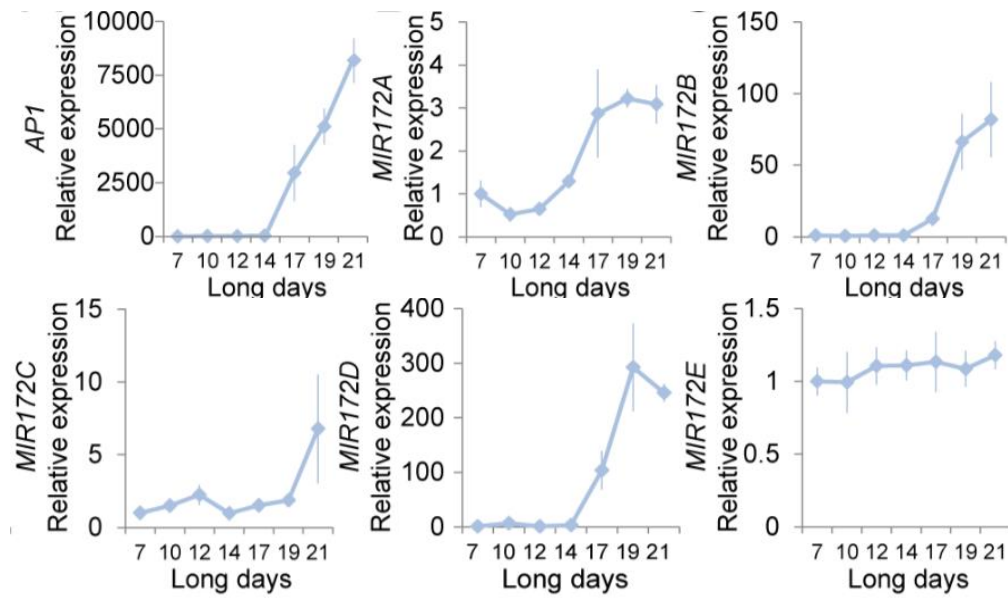
.miR172a, b	UACGUCGUAGUAGUUCUAAGA
.miR172c, d	gACGUCGUAGUAGUUCUAAGA
.miR172e	UACGUCGUAGUAGUUCUAAGg

**Figura 10. Secuencias nucleotídicas de las diferentes formas maduras de miRNA172 en *Arabidopsis* (Zhu y Helliwell, 2011).**

Los diferentes miembros de la familia miRNA172 no solo son redundantes, sino que también confieren especificación funcional que puede atribuirse a un patrón de expresión distinto, por lo que contribuyen de manera diferente a la regulación del tiempo de floración (Lian *et al.*, 2021). Esta redundancia y especificidad aumenta la robustez y las dimensiones de las redes reguladoras de los genes subyacentes a la floración (Zhang & Chen, 2021).

MiRNA172 no solo está regulado por el aumento dependiente de la edad en la expresión del gen SPL, sino también por las vías de floración del fotoperiodo y la temperatura ambiente (Jung *et al.*, 2007; Yamaguchi y Abe, 2012). Por lo tanto, representa un centro muy importante para la integración de estas vías de floración.

Recientemente se ha descrito de forma precisa el patrón de expresión de los diferentes miRNA172 (Figura 12) en etapas tempranas del desarrollo y la transición floral (Lian *et al.*, 2021 y Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2021). A pesar de ello, aún no se ha caracterizado su expresión en etapas tardías del desarrollo (el desarrollo de la inflorescencia o bien, el desarrollo del fruto y las semillas).



**Figura 11. Patrones de expresión de la familia de genes MIR172 en el ápice del brote (Ó'Maoiléidigh et al., 2021).**

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Recientemente han sido publicados dos artículos (*Lian et al., 2021* y *Ó'Maoiléidigh et al., 2021*) donde se describe el patrón de expresión de los diferentes MIR172 en el SAM durante la transición floral. A pesar de que cada vez se dispone de un mayor conocimiento sobre la regulación ejercida por los miRNA, el estudio de la regulación de *AP2* por los diferentes miRNA172 presenta una mayor complejidad ya que se ejerce tanto a nivel transcripcional como a nivel postranscripcional.

El hecho de que se detecte una elevada concentración de miRNA172 maduro en el SAM y que la concentración de *AP2* detectada sea muy baja en el mismo, reflejan la posibilidad de que tanto *ful* como miRNA172 regulen a la baja de forma complementaria (a nivel transcripcional y postranscripcional, respectivamente) los niveles de *AP2* (*Lian et al., 2021* y *Ó'Maoiléidigh et al., 2021*).

En el momento del final de la floración (GPA), los niveles de expresión de los genes *AP2* son muy bajos en el SAM, y la presencia de la proteína *AP2* no es detectable con los métodos disponibles hasta la fecha. Además, datos disponibles en el laboratorio donde se realiza este trabajo indican que los diferentes miRNA172 no se expresan en el SAM, a pesar de que la caracterización de un quintuple mutante *mir172* muestra un claro retraso del momento del GPA, al igual que lo hacen versiones resistentes de *AP2* a la acción del miRNA172 (*Balanza et al., 2018*: datos no publicados). Aunque estos datos sugieren un papel para el miRNA172 en el SAM, se necesitan herramientas adicionales a las disponibles para poder detectar su actividad y confirmar su papel durante el control del GPA.

Con el desarrollo de este trabajo, se pretende generar y caracterizar una serie de nuevos sensores que permitan monitorizar la actividad de los diferentes miRNA172 en planta. Para ello, se ha intentado llevar a cabo la consecución de los siguientes objetivos:

1. Caracterización de sensores fluorescentes para el estudio de la regulación de los distintos miRNA172 sobre *AP2* en *N. benthamiana*.
2. Caracterización de sensores fluorescentes para el estudio de la regulación de los distintos miRNA172 sobre *AP2* en *A. thaliana*.
3. Generación de un sensor visible a simple vista para el estudio de la regulación de miRNA172 sobre *AP2*.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. MEDIOS EMPLEADOS

#### 3.1.1. MEDIO DE CULTIVO

##### 3.1.1.1. MICROORGANISMOS

El medio empleado para el crecimiento de los microorganismos, tanto en cultivo líquido como en sólido, fue Luria-Bertani (LB). Este medio se empleó para el crecimiento de las bacterias *E. coli* y *Agrobacterium* transformadas.

Para la preparación de 1 L de LB líquido se disolvieron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 800 ml y posteriormente la disolución se enrasa hasta 1 L con H<sub>2</sub>O destilada, obteniendo unas concentraciones finales de 1% (m/v) de triptona, 0.5% (m/v) de extracto de levadura y 1% (m/v) de NaCl.

Para la preparación de 1 L de LB sólido se le añadiría a la preparación anterior 3 g de agar bacteriológico por cada 200 ml de LB.

Por último, se esteriliza a 120°C en un autoclave a una presión de 1 bar durante 20 min.

##### 3.1.1.2. NICOTIANA BENTHAMIANA

Las plantas empleadas fueron cultivadas en macetas con un sustrato obtenido al mezclar una proporción similar de vermiculita y turba.

##### 3.1.1.3. ARABIDOPSIS THALIANA

Las semillas de Arabidopsis quintuple mutante para MIR172 fueron germinadas en medio MS líquido. Para la preparación de MS líquido se disolvieron 2.17 g de sales de Murashige-Skoog y 5 g de sucrosa en 1 L de H<sub>2</sub>O destilada y se ajustó su pH a 5.7 añadiendo KOH con ayuda de un pHmetro. Finalmente, la disolución fue autoclavada a 120°C y 1 bar de presión durante 20 min.

#### 3.1.2. MEDIO DE INFILTRACIÓN

El medio empleado para llevar a cabo la infiltración en *N. benthamiana* estaba constituido por una solución de MgCl<sub>2</sub> a 10 nM MES a 10 mM cuyo pH fue ajustado con KOH hasta alcanzar un pH de 5.6.

#### 3.1.3. MEDIO AB-MES

Para la preparación del medio AB-MES se prepararon y autoclavaron por separado 900 mL de sales de AB (3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.15 g KCl y 9.76 g MES; ajustado a un pH de 5.5 mediante la adición de HCl) y 100 mL de una solución de glucosa al 20%.

Ambas disoluciones se mezclaron (obteniendo 1 L en total) y posteriormente se añadió a través de Minisart® Syringe Filter 1 ml de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (250 mg/100 ml), 1 ml de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.25 M y 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M para conservar así la esterilidad del medio.

#### 3.1.4. MEDIO DE INFECCIÓN

Se preparó justo antes de cada uso. Constituido por 50% de medio MS (apartado 3.1.1.3) y 50% de medio AB-MES (apartado 3.1.3), añadiendo AS hasta una concentración final de 200 µM.

### 3.2. CONDICIONES DE CULTIVO

#### 3.2.1. MICROORGANISMOS

El cultivo en medio líquido de los microorganismos se llevó a cabo en cabinas termostáticas provistas de agitadores. En el caso de *E. coli*, se incubaron en cabinas a 37°C durante 16 horas, manteniendo una agitación orbital de 225 rpm. En el caso de *A. tumefaciens*, la temperatura de incubación fue de 28°C durante 24 horas, con una agitación orbital idéntica a la empleada en la incubación de *E. coli*.

En el caso del cultivo de los microorganismos en medio sólido (Placas de Petri) también se llevó a cabo en las mismas cabinas termostáticas pero sin agitación.

Además, en el caso del cultivo de *A. tumefaciens*, el periodo de incubación se alargó hasta las 48 horas.

### 3.2.2. MATERIAL VEGETAL

El cultivo de *Nicotiana* y *Arabidopsis* se realizó en cámaras de crecimiento bajo un intervalo térmico de 23°C (día) y 18°C (noche), una humedad relativa 60-65% y un fotoperiodo de 16 hr de luz / 8 hr de oscuridad.

### 3.3. PLÁSMIDOS EMPLEADOS

En función del plásmido que porte el microorganismo transformado, se suplementará al medio de cultivo LB los distintos antibióticos (Tabla 1) para la selección y crecimiento de las estirpes deseadas según el gen de resistencia que posea dicha construcción. Para ello, tras autoclavar el medio LB, se atemperó a 55°C y añadió el antibiótico correspondiente dependiendo de la finalidad.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	PLÁSMIDO
Rifampicina	100 µg/ml	<i>A. tumefaciens</i>
Rifampicina + Tetraciclina	100 µg/ml	<i>A. tumefaciens</i>
Kanamicina	50 µg/ml	C58C1(pTiB6S3ΔT-DNA, pCH32)
Spectinomycin	100 µg/ml	p35S:miRNA(A-E)-p35S:dsRED-p35S:YFP(m3/ap2)
		p35S:dsRED-p35S:YFP(m3/ap2), UBQ-RUBY

Tabla 1. Antibióticos empleados para la selección de los diferentes microorganismos transformados en medio LB.

#### 3.3.1. SENSORES MIRNA

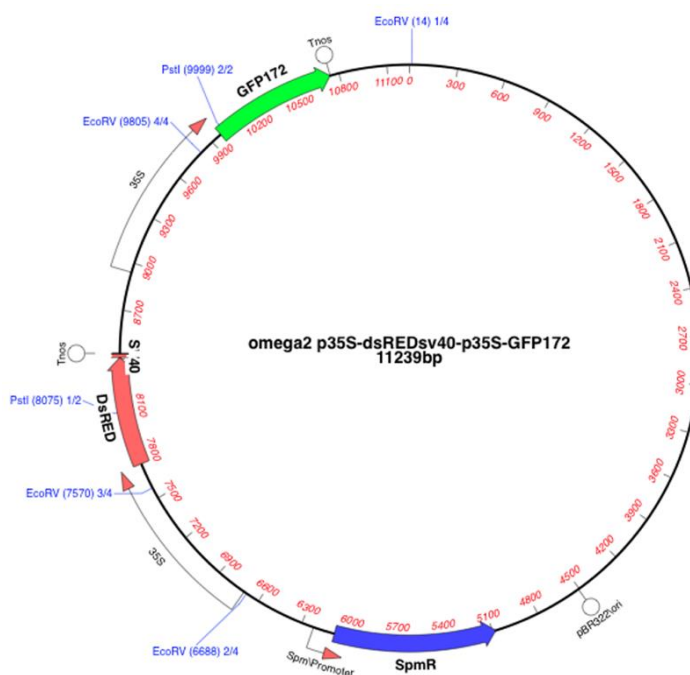
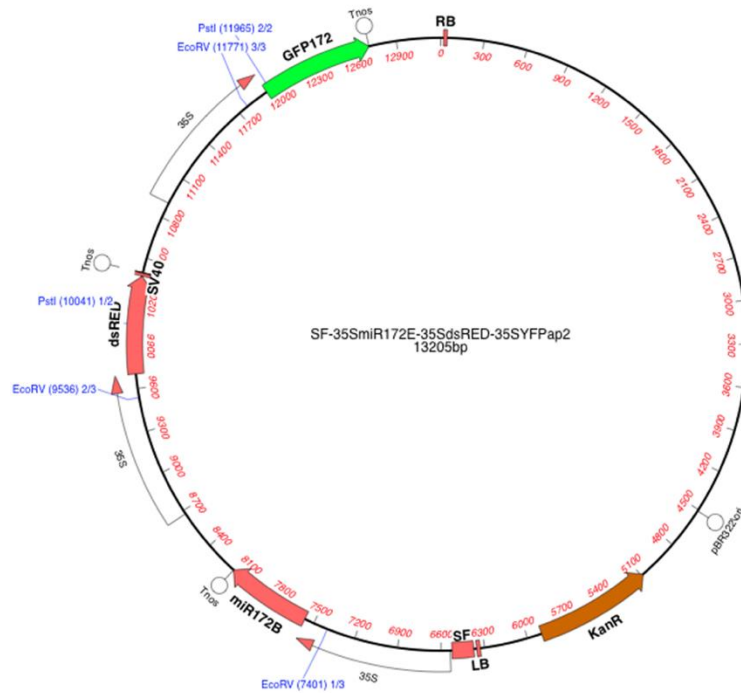


Figura 12. Representación esquemática de la construcción p35S::dsRED-p35S::YFP(m3/ap2). Constituido por la secuencia de la proteína DsRed y la secuencia de la proteína YFP que posee (AP2) o no

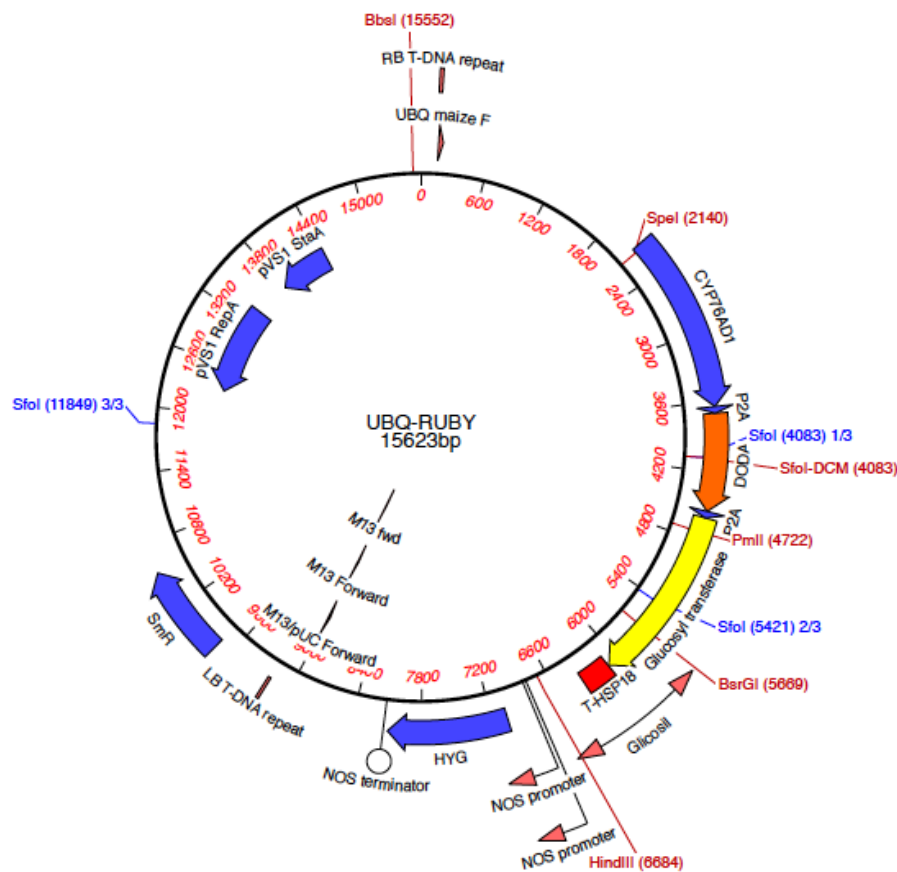
(m3) el sitio de unión del miRNA172 de AP2. Ambos módulos dirigidos de manera independiente por el promotor constitutivo 35S.



**Figura 13. Representación esquemática de la construcción p35S::miRNA(A-E)-p35S::dsRED-p35S::YFP(m3/ap2).** Constituido por la secuencia de la proteína DsRed y la secuencia de la proteína YFP que posee (AP2) o no (m3) el sitio de unión del miRNA172 de AP2, ambos dirigidos por el promotor 35S. Además, este cuenta con un tercer módulo de expresión dirigido por el promotor 35S, constituido por la secuencia de cada miembro miRNA172.



### 3.3.2. SENSOR UBQ-RUBY



**Figura 14. Representación esquemática del plásmido UBQ-RUBY.** Constituido por un solo marco de lectura abierto (RUBY) donde se incluyen las regiones codificantes de CYP76AD1, DODA y Glucosyltransferase (necesarias para la síntesis de betalaina). Los tres genes se encuentran unidos por secuencias que codifican péptidos 2A, que permiten la expresión de múltiples proteínas bajo el control de un solo promotor (He et al., 2020).

### 3.4. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE E. COLI Y A. TUMEFACIENS

Se empleó el kit comercial NZYMiniprep para la purificación del DNA plasmídico partiendo de 3 ml de medio de cultivo donde crecían *E. coli* o *A. tumefaciens* según se ha descrito en el apartado 3.2.1. Para comprobar la eficacia de la purificación y la concentración de DNA plasmídico obtenido, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

### 3.5. VALIDACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES

Para asegurar que las construcciones de partida y las que se generaron en el apartado 3.13, se llevó a cabo la digestión de una alícuota de 2 µL del DNA obtenido en el apartado 3.4 empleando kit comercial NZYMiniprep.

Todas las digestiones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1.5 ml, con 5-10 unidades de la enzima correspondiente (reflejadas en la Tabla 2) por µg de DNA, incubándose a la temperatura óptima de cada enzima durante 1-2 horas.

El resultado se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa, como se describe en el apartado 3.6.

Los patrones de bandas esperados son específicos de cada construcción, por lo que mediante este método es posible discernir entre construcciones correctas e incorrectas.

CONSTRUCCIÓN	ENZIMAS DE RESTRICCIÓN
35SmiRNA172(a-e)-35SdsREDsv40-35SGFP172	EcoRV, PstI
35SmiRNA172(a-e)-35SdsREDsv40-35SGFPap2	EcoRV, PstI
UBQ-RUBY	PstI, HindIII
UBQ-GT-RUBY	PstI, HindIII y BsrGI + HindIII
PROM-GT-RUBY	PstI, HindIII y BbsI + SpeI
UBQ-DODA-RUBY	PstI, HindIII y SpeI + PmII

**Tabla 2.** Lista de enzimas de restricción utilizadas para validar por digestión las construcciones generadas y de partida.

### 3.6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para la separación de los fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa a una concentración del 0.8% (p/v) en tampón TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 8). Para poder visualizar el DNA al exponer el gel a luz ultravioleta, en el momento previo a la solidificación de la agarosa, se adicionaron 0.5 µg/ml de bromuro de etidio.

La polimerización del gel tuvo lugar a temperatura ambiente en un sistema de preparación de geles (*gel casting*).

Previamente a la carga de las muestras en el gel, se añadió tampón de carga *6X Orange DNA Loading Dye* (Thermo Scientific).

Posteriormente, el gel se introdujo en una cubeta de electroforesis con tampón TAE 1X y uno de los carriles del gel se reservó para incluir 5 µL del marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder* o *GeneRuler Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific) y poder estimar así los tamaños de los fragmentos de las muestras mediante la comparación de su patrón de pesos moleculares.

Una vez cargadas todas las muestras, se corrieron a 100V durante 1-1.5 h. Por último, la visualización del patrón de bandas se llevó a cabo mediante un transiluminador UVIDOC HD6 (Uvitec).

### 3.7. TRANSFORMACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

En ambos casos, en primer lugar se descongelan en hielo las células competentes que se desean transformar.

BACTERIA	MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Electroporación
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Agrobrest)	Electroporación
<i>Escherichia coli</i> (One Shot TOP10)	Choque térmico
<i>Escherichia coli</i>	Electroporación

**Tabla 3.** Microorganismos empleados y métodos de transformación.

#### 3.7.1. ELECTROPORACIÓN

En el caso de seguir el protocolo de electroporación, se añaden 0.8-1 µL de DNA a las células competentes y se homogeniza. Esta mezcla se introduce en una cubeta de 0.1 cm de separación entre electrodos (BioRad), enfriada previamente en hielo y mediante GenePulse TM (BioRad) se somete a una corriente eléctrica de 1600 V.

Seguidamente, se añade 1 ml de LB sin antibióticos a la cubeta y la mezcla se transfiere a un eppendorf limpio, incubándose a 37°C en el caso de *E. coli* o bien, a 28°C en el caso de *A. tumefaciens*. Ambas manteniéndose a 600 rpm manteniendo una agitación orbital adecuada durante 1-2 horas para su recuperación.

Una vez transcurrido ese tiempo, se plaquean 50 µL y la fracción resto en placas de Petri de LB sólido con el antibiótico de selección correspondiente a cada construcción introducida.

### 3.7.2. CHOQUE TÉRMICO

En el caso de seguir el protocolo de choque térmico o *Heat Shock*, se añade 9  $\mu$ L de DNA a las células competentes (*E. coli*) y se homogeniza. Esta mezcla mantenida en hielo se introduce en el aparato Precistern, exponiéndose a un baño de agua a 42°C durante 45 s.

Una vez transcurrido ese corto periodo de tiempo, se vuelven a introducir en hielo.

Posteriormente, se añade 1 ml de LB sin antibióticos y se incuban a una temperatura de 37°C a 600 rpm durante 1 h. Por último, al igual que en el apartado anterior, se plaquean 50  $\mu$ L y la fracción resto en placas de Petri de LB sólido con el antibiótico de selección correspondiente.

## 3.8. TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA MEDIADA POR AGROBACTERIUM

### 3.8.1. N. BENTHAMIANA

El día anterior a la infiltración, se preparan precultivos líquidos de 5 mL a partir de los cultivos de *A. tumefaciens* transformados con cada construcción, con un medio y unas condiciones de cultivo especificadas en los apartados 3.1.1.1 y 3.2.1 respectivamente.

El día en el que se lleva a cabo la infiltración, se centrifugan los precultivos a 4000 rpm durante 10 min, quedando un pellet de *Agrobacterium* que es resuspendido en medio de infiltración (apartado 3.1.2).

Mediante espectrometría, se ajusta la densidad bacteriana a una OD<sub>600</sub> de 0.2. Una vez ajustada, se añade acetosiringona (AS) hasta alcanzar 200  $\mu$ M y se mantuvo en agitación a 28 rpm y oscuridad durante 3 horas.

Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo la infiltración de 2 mL de la suspensión bacteriana de cada construcción a hojas jóvenes de *N. benthamiana* con una jeringuilla aplicando presión contra el envés.

### 3.8.2. A. THALIANA

Las semillas de *A. thaliana* quintuple mutante para el microRNA172 son esterilizadas previamente en una disolución compuesta por un 50% de lejía y un 0.05% de Triton X-100 durante 10 min. Transcurrido ese tiempo, son sometidas a 5 lavados de agua estéril para eliminar los restos de la disolución previa y finalmente se conservan 3 días a 4°C antes de su germinación. Posteriormente, se induce a su germinación traspasándolas a una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos (10 semillas por pocillo) con medio MS a 22°C, 16 h luz/ 8 h oscuridad durante 4 días antes de la infección.

Al igual que en el caso de *N. benthamiana*, se preparan precultivos líquidos de 5 mL a partir de *A. tumefaciens* competentes específicas del protocolo “Agrobest” a las que se les había incorporado las construcciones por electroporación (apartado 3.7.1).

Estos cultivos se incuban en un medio y unas condiciones determinadas reflejadas en los apartados 3.1.1.1 y 3.2.1 durante 1 día. Posteriormente se centrifugan durante 10 min a 4000 rpm y el pellet resultante es resuspendido en medio AB-MES (apartado 3.1.3) con 200  $\mu$ M de AS sin antibióticos para la preinducción de *Agrobacterium* a la infección, ajustando la OD<sub>600</sub> a 0.2. Después se deja crecer 16 horas en oscuridad a una agitación de 220 rpm.

Transcurrido ese tiempo, los diferentes cultivos volvieron a ser centrifugados a 4000 rpm durante 10 min y resuspendidos en medio de infección (apartado 3.1.4), ajustando a una OD<sub>600</sub> de 0.02 con ayuda del espectrofotómetro.

Una vez ajustada la OD<sub>600</sub>, el medio MS donde se había inducido la germinación de las semillas de *A. thaliana* es reemplazado por la suspensión de *A. tumefaciens*.

Este co-cultivo *Agrobacterium-Arabidopsis* se mantuvo a 22°C con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad durante 4 días hasta el análisis de su fenotipo.

## 3.9. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Las muestras transformadas fueron analizadas mediante un microscopio confocal invertido Zeiss 71. En el caso de *Nicotiana*, se analizó el envés de los discos de las hojas transformadas con ayuda

de un sacabocados, mientras que en el caso de *Arabidopsis* fue estudiado el envés de los cotiledones de las plántulas. Ambas preparaciones se realizaron en un portaobjetos con agua destilada.

Las proteínas fluorescentes incorporadas en el sensor fueron YFP, con una longitud de onda de excitación de 514 nm y una longitud de onda de emisión máxima de 527 nm; y DsRed, que posee una longitud de onda de excitación de 558 nm y una longitud de onda de emisión máxima de 583 nm. Cada proteína fluorescente se fijó en un canal, seleccionando únicamente la proteína DsRed para el *screening* (20X) de los núcleos transformados con el modo *live* del microscopio.

Se fijó una sensibilidad para las proteínas YFP y DsRed utilizando el control m3 para la realización de todas las imágenes, capturadas mediante el software *ZEN*.

Puesto que ambas proteínas fluorescentes poseen una señal de localización nuclear, su fluorescencia quedó restringida a los núcleos celulares.

Una vez localizado el núcleo transformado que se quiere fotografiar con el track para el rojo (DsRed), se selecciona también el track para el verde (YFP) y se captura la imagen con la opción *snap*, seleccionando la ventana *split* para la captura de ambas fluorescencias.

Estos parámetros fueron fijados para la captura de un determinado número de núcleos y para la realización de cálculos posteriores.

La intensidad de ambas fluorescencias de cada núcleo fue analizada mediante el programa de análisis de imagen *Fiji*. Para ello, mediante la opción *split channels* (seleccionando *color in image*), se descompone la imagen seleccionada con las dos fluorescencias por separado y se selecciona el área a analizar en una de ellas, midiendo su intensidad en *measure (image)*.

Para medir la intensidad de la otra proteína fluorescente, se copia el mismo área en la otra imagen con la opción *restore selection in edit*.

### 3.10. AMPLIFICACIÓN POR PCR

La obtención de los insertos para la realización del clonaje In-Fusion del apartado 3.13 se realizó mediante reacciones PCR individuales con cada pareja de cebadores (1.5  $\mu$ L cada uno) sobre 2  $\mu$ L del DNA molde correspondiente (Tabla 4).

La reacción se llevó a cabo con 0.5  $\mu$ L del enzima *taq Phusion*, junto con 10  $\mu$ L de *5X Phusion HF Buffer*. Además, se añadió 1  $\mu$ L de dNTP, 1.5  $\mu$ L de DMSO y 32  $\mu$ L de agua hasta alcanzar un volumen final de 50  $\mu$ L.

Las condiciones de la amplificación fueron: un primer paso de desnaturalización a 98°C durante 30 s, seguido de 35 ciclos a 98°C durante 10 s para la desnaturalización, 20 s a 60°C para la hibridación y 1 min a 72°C para la elongación, seguidos de 5 minutos finales de extensión a 72°C.

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	MOLDE
F1 DODAp2 F.	GGTGTTACTTCTGCAGAACTAGTATGGATCATGCGACCC	UBQ-RUBY
F1 DODAp2 R.	AGAATCCTGATGATGCTGCAGCGGAGGTGAACTTGTAGGAGCCG	
F2 DODAp2 F.	TGCAGCATCATCAGGATTCTCTGCCGGATCCGGAGCAACCAAC	
F2 DODAp2 R.	GTGAGCAGGGTGATGATCACGTGGGAGCGCTTGTAGAGG	
F1 GTap2 F.	AACAGGGCAAGCTCGTGTACAAGCTCGGCCCGCAGCTTGAGATCC	
F1 GTap2 R.	GAATCCTGATGATGCTGCAGCGCCTGCATGACGGCGTGC	
F2 GTap2 F.	CTGCAGCATCATCAGGATTCTCTAAACTTGAGCCAAGCCTC	
F2 GTap2 R.	CCCGCCTTCAGTTTCAAGCTTGTGTTGGGGATCTAGTGTTTTACTC	
F1 RB T-DNA repeat F.	CGTTTTTCAGAAGACGGCTGCACTGAACGTCAGAAGCCGACT	
F1 RB T-DNA repeat R.	ATCTCCTGCTTGACAGGATATATTGGCGGGT	
F2 RPS5A promoter F.	TATCCTGTCAAGCAGGAGATCTATCAGTGCAGTC	pRPS5A miRB-GUS $\alpha$ 1
F2 RPS5A promoter R.	GGTCGCATGATCCATACTAGTGGCTGTGGTGAGAGAAACAGAG	

**Tabla 4. Cebadores empleados para la obtención de los diferentes insertos del clonaje In-Fusion.**

Una vez ha tenido lugar la reacción, se realizó una electroforesis de las diferentes reacciones como se describe en el apartado 3.6.

Por último, los insertos PCR fueron purificados siguiendo el protocolo del apartado 3.12 a partir de la porción del gel de agarosa que contenía dicho fragmento y su concentración fue cuantificada mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

### 3.11. DIGESTIÓN DE DNA PLASMÍDICO

La obtención de los diferentes vectores linealizados se llevó a cabo realizando 4 digestiones simultáneas, de 12 µL de DNA obtenido en el apartado 3.4., para poder recuperar una concentración de vector linealizado que permita llevar a cabo el clonaje descrito en el apartado 3.13.

Las condiciones de las digestiones del DNA plasmídico fueron similares a las del apartado 3.5, utilizando 5-10 unidades de las enzimas correspondientes (reflejadas en la Tabla 5) por µg de DNA. Se utilizó el buffer 5X Tango (con BSA) para todas las combinaciones de enzimas, incubándose a 37°C durante 2 horas.

Posteriormente, la digestión se cargó en un gel de agarosa y se llevó a cabo una electroforesis tal y como se describe en el apartado 3.6.

Por último, al igual que con los insertos PCR, el vector lineal fue purificado siguiendo el protocolo del apartado 3.12.

FRAGMENTO A INTRODUCIR	ENZIMAS DE RESTRICCIÓN
Promotor RPS5A	BbsI + SpeI
DODA <sup>172</sup>	SpeI + PmII
GT <sup>172</sup>	BsrGI + HindIII

**Tabla 5. Pareja de enzimas de restricción empleadas para la linealización del vector.**

### 3.12. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Para la purificación de los fragmentos obtenidos en los apartados 3.10 y 3.11 se empleó el kit comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit.

La pieza del gel de agarosa que contiene el DNA de interés se cortó mediante una cuchilla bajo la luz ultravioleta del transiluminador UVIDOC HD6 (Uvitec).

La eficacia de la purificación y la concentración del DNA se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

### 3.13. CLONAJE IN-FUSION

El clonaje de los distintos vectores UBQ-RUBY modificados se llevó a cabo siguiendo el protocolo *In-FusionR HD Multiple-Insert Cloning*, en el que el ratio molar de los dos insertos de PCR purificados con el vector linealizado fue de 2:2:1.

La reacción se llevó a cabo en un tubo eppendorf de 1.5 mL, empleando 2 µL del enzima 5X *In-Fusion HD Enzyme Premix*, junto con una cantidad determinada de vector linealizado (obtenido en 3.11.) y de los dos insertos PCR purificados (obtenidos en 3.10) correspondientes, y agua desionizada hasta alcanzar los 10 µL.

Tras homogeneizar la mezcla, se incubó a 50°C durante 15 min.

Por último, se llevó a cabo la transformación de *E. coli* mediante el protocolo de choque térmico especificado en el apartado 3.7.2 y se plaquearon 50 µL y la fracción resto en placas de Petri de LB sólido con Streptomycin.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE SENSORES FLUORESCENTES PARA EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS DISTINTOS MIRNA172 SOBRE AP2 EN *NICOTIANA BENTHAMIANA*

El estudio de la regulación de *AP2* por los diferentes miRNA172 puede resultar complicado debido a la compleja regulación a la que está sometido, tanto a nivel transcripcional como a nivel postranscripcional. Por este motivo, en el laboratorio donde se ha realizado este TFG se desarrollaron sensores moleculares (apartado 3.3.1) que permitieran detectar la actividad de los diferentes tipos de miRNA172 maduros presentes en *Arabidopsis*.

Estas construcciones sintéticas incluyen la proteína fluorescente YFP fusionada al sitio de unión del miRNA172 en el gen *AP2* silvestre, convirtiéndola en una diana del miRNA (sensor AP2 (Figura 12)), o bien una secuencia similar (m3) con mutaciones que impiden el reconocimiento por el miRNA172, que será insensible a la presencia del miRNA (sensor m3) y que permitirá establecer las condiciones y umbrales de detección en el experimento. Estas construcciones contienen, por otra parte, la proteína fluorescente dsRED (elemento de normalización).

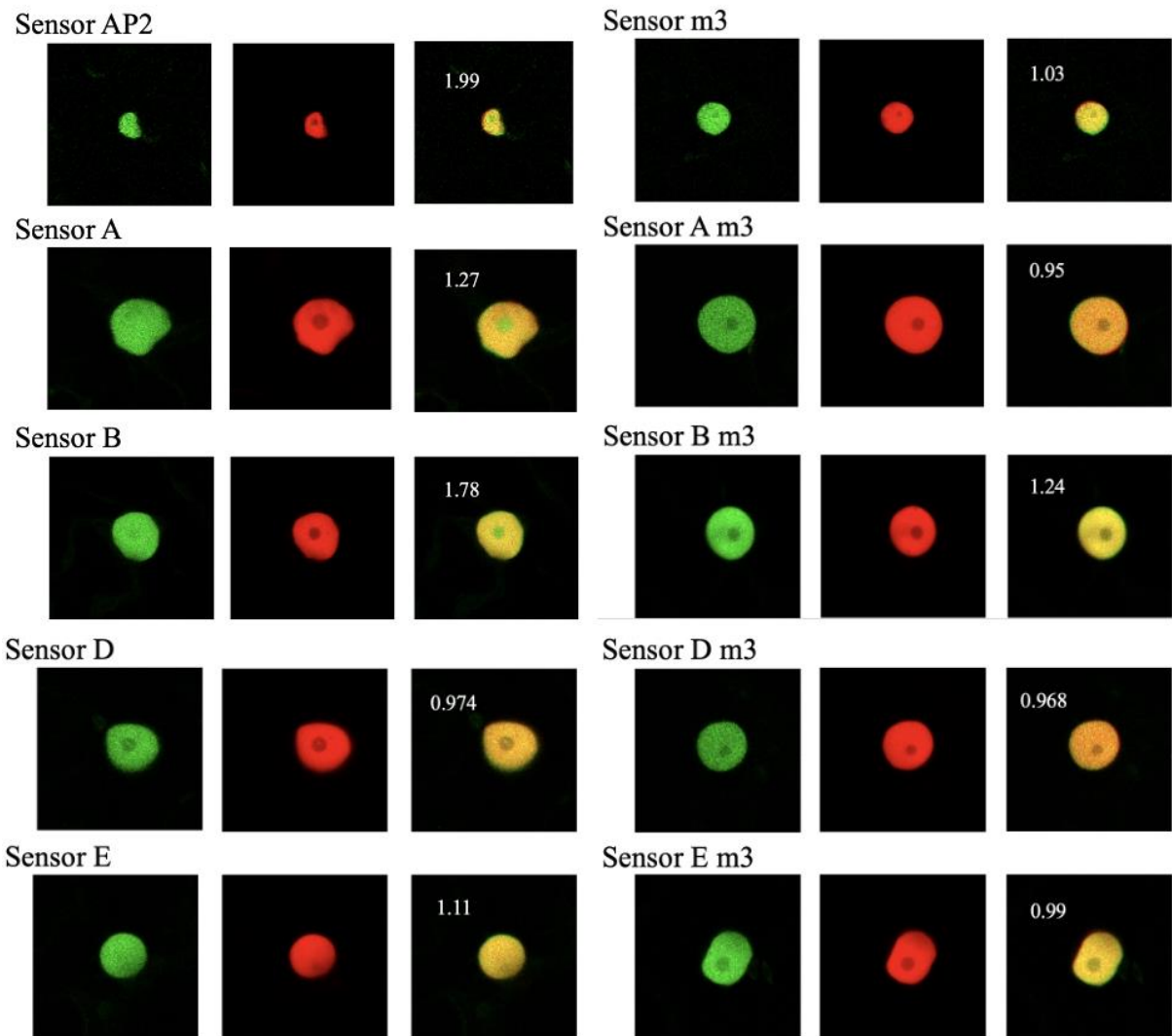
Ambos componentes codifican proteínas fluorescentes espectralmente distintas dirigidas al núcleo (mediante una señal de localización nuclear, SV40), expresados bajo el control del promotor CaMV35S de forma independiente.

Su coexpresión estequiométrica permitiría monitorizar la actividad del miRNA172 como una disminución de YFP en relación con la proteína fluorescente DsRED (ratio YFP/DsRed) mediante microscopía de barrido láser confocal, ya que la única diferencia entre ambas radica en la presencia o ausencia del sitio de unión del miRNA172 de *AP2*, permitiendo así analizar la actividad de los miRNA172 endógenos de la planta.

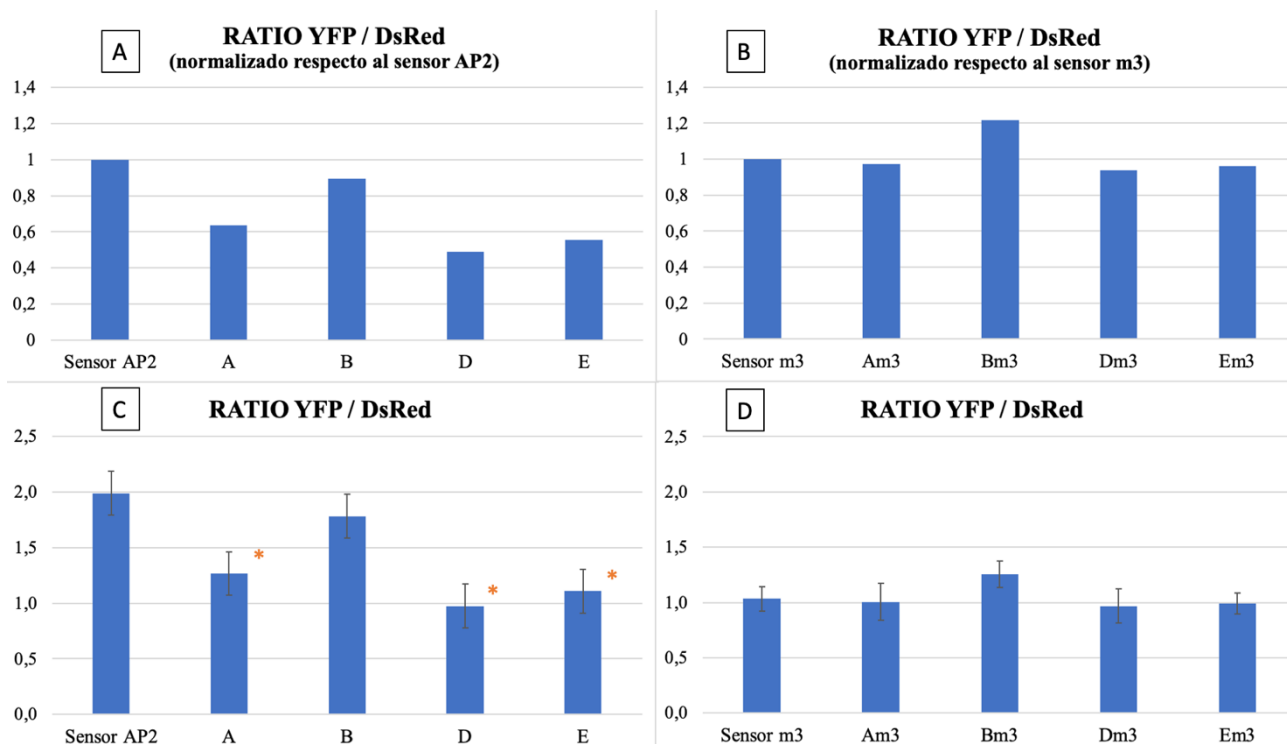
Además, contamos con la pareja de sensores A/Am3, B/Bm3, D/Dm3 y E/Em3 (Figura 13), que son construcciones donde a cada uno de los sensores descritos previamente (sensor AP2 y sensor m3) se les ha añadido un módulo adicional de sobreexpresión (promotor CaMV35S) del miRNA172 indicado, permitiendo analizar el efecto individual de cada miRNA sobre el sensor.

Con el fin de testar la utilidad de estos sensores, se llevó a cabo la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, siendo sus núcleos analizados por microscopía confocal 3 días después de la infiltración.

Tras el análisis de las fotografías de los núcleos de *Nicotiana* con el programa *Fiji* (algunos de ellos representados en la Figura 15), se llevó a cabo la representación de los ratios de fluorescencia (Figura 16) y las intensidades promedio de cada proteína (Figura 17).



**Figura 15. Análisis de fluorescencia de núcleos celulares de *Nicotiana benthamiana* a día 3 de la infiltración.** Se analizaron las intensidades de las proteínas fluorescentes YFP y DsRed por separado y el ratio YFP/DsRed para cada ensayo mediante el programa *Fiji*. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal a 20X, con un láser de excitación de 514 nm.



**Figura 16. Diagramas de barras representando los ratios de fluorescencia YFP/DsRed de los núcleos transformados de *Nicotiana benthamiana* y su desviación estándar (barras de error). Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).**

Al analizar los datos obtenidos con los diferentes sensores m3 y tras su normalización frente al control m3 (Figura 16B), se puede observar que el comportamiento de los sensores m3 es similar a pesar de que cada uno sobreexpresa un miembro distinto de la familia miRNA172. Este resultado indica que la versión m3 es insensible al efecto de los diferentes miRNA172 como se esperaba.

Al analizar los datos obtenidos normalizados con los sensores AP2 (Figura 16A), se observó que una disminución de los ratios YFP / DsRed en presencia de los diferentes miRNA172. Este comportamiento concuerda con la esperada represión que debería ejercer cada miRNA172 testado sobre la proteína fluorescente YFP (fusionada al sitio de unión del miRNA172 en el gen AP2 silvestre).

A pesar de estos prometedores resultados, parte de los datos obtenidos llamaron nuestra atención. Al analizar los datos brutos de los ratios YFP / DsRed (Figuras 16C y 16D) se observó que mientras que las diferentes versiones del sensor m3 se comportaban según lo esperado (con un ratio alrededor de 1), el sensor AP2 duplicaba el valor de su ratio esperado (1.99), mientras que las versiones que incluían los diferentes miRNA172, a pesar de presentar ratios menores que el control AP2, presentaban ratios mayores o similares que sus versiones insensibles a miRNA. Estos inesperados resultados indicaban que los diferentes sensores AP2 y m3 podrían estar comportándose de forma muy diferente.

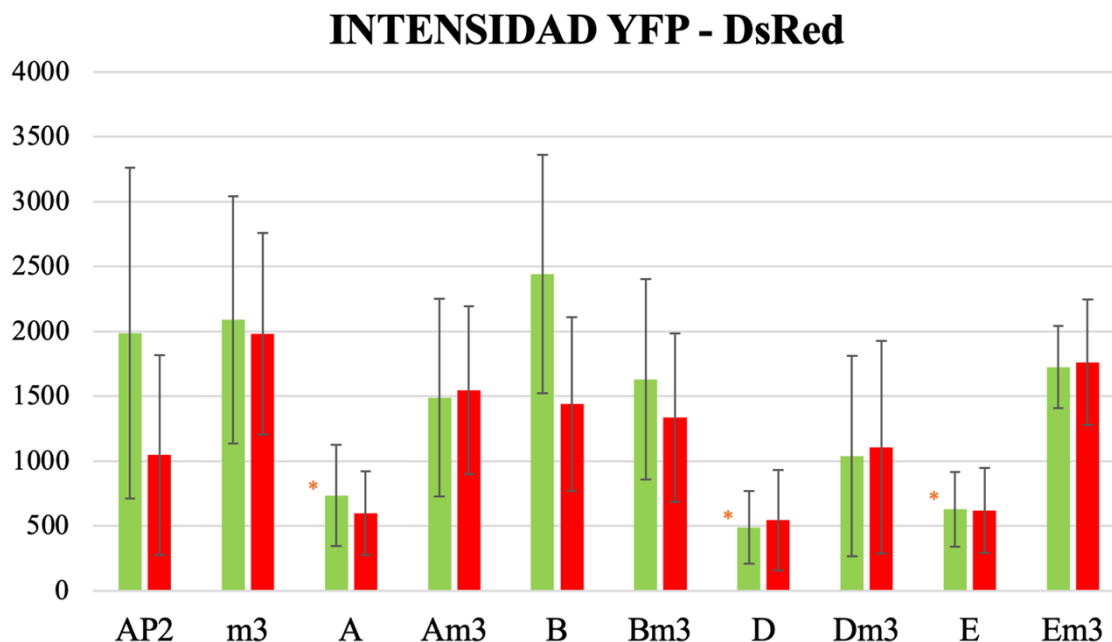
Para intentar averiguar qué podría explicar este comportamiento diferencial se decidió analizar los datos crudos de intensidad y comprobar si los valores de los ratios se debían a una disminución en la intensidad de la proteína verde YFP como cabría esperar. Para ello, se representaron las intensidades medias de ambas proteínas (Figura 17) en cada experimento.

Al analizar los sensores AP2 y m3 (controles sin miRNA172) se observó que la intensidad de la señal de la proteína YFP (módulo sensor) entre ambos sensores era parecida (AP2:  $1985 \pm 1275$ ; m3:  $2089 \pm 952$ ), pero sorprendentemente, la intensidad promedio de DsRed (elemento de



normalización) mostraba un valor más bajo de lo esperado en el sensor AP2, siendo la mitad con respecto al sensor m3.

Este efecto (baja intensidad del módulo normalizador) se observó con mayor intensidad en todas las líneas del sensor AP2, que incluían un módulo de sobreexpresión de un miRNA172, mientras que los mismos módulos en el sensor m3 no presentaban esta reducción drástica de la señal normalizadora.

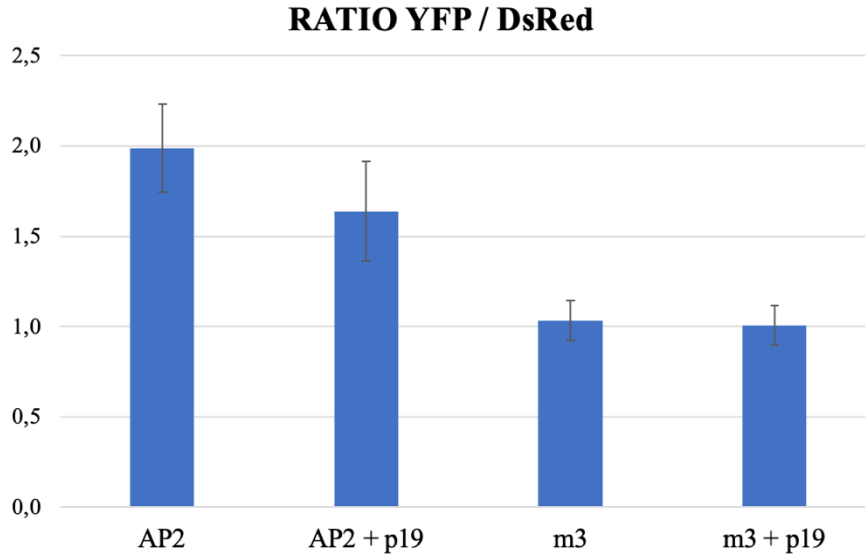


**Figura 17. Diagrama de barras mostrando el valor de intensidades promedio (YFP en verde, DsRed en rojo) de cada sensor analizado en *Nicotiana benthamiana* y su desviación estándar (barras de error). Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).**

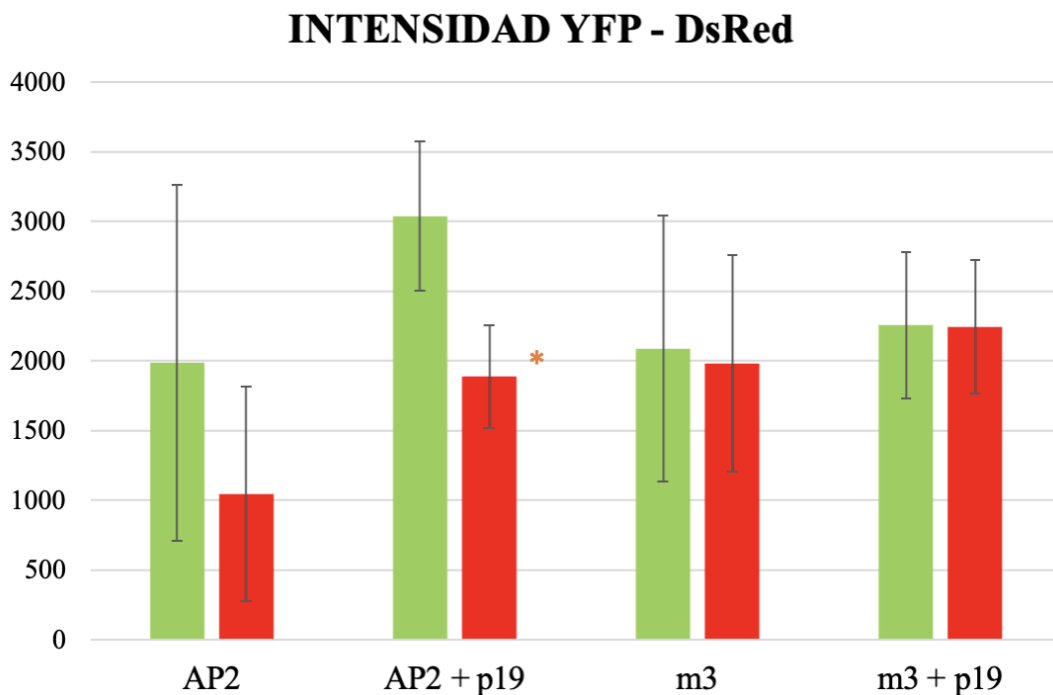
En ocasiones, cuando se introducen transgenes en una célula vegetal, estos son reconocidos como exógenos y la planta media su silenciamiento. Esta podría ser una explicación para el fenómeno observado, pero aún así, resulta extraño que el fenómeno solo se diera en los sensores donde estaba presente el sitio de reconocimiento para el miRNA172, y que ese silenciamiento fuera mucho mayor en presencia de altos niveles de miRNA172.

En los fenómenos de silenciamiento de transgenes participa la proteína AGO1 mediando inicialmente la escisión de los RNA foráneos. A partir de estos productos de escisión la planta genera una serie de señales que finaliza con la metilación del DNA del que proceden provocando su silenciamiento.

Con el fin de descartar el silenciamiento de nuestros transgenes, se llevó a cabo la infiltración de los sensores AP2 y m3 junto con una construcción que contenía la secuencia de la proteína p19. La proteína p19 es un supresor viral de silenciamiento de RNA (VSR) cuya expresión previene la carga de los RNA pequeños en AGO1, inhibiendo así la formación del complejo RISC (Danielson y Pezacki, 2013), y por tanto, la vía del silenciamiento dependiente de AGO1, aunque por otro lado interferiría en el normal funcionamiento del miRNA172, dependiente de AGO1.



**Figura 18.** Diagrama de barras representando los ratios de fluorescencia YFP/DsRed de los núcleos transformados de *Nicotiana benthamiana* y su desviación estándar (barras de error). Por un lado, los ratios de los sensores AP2 y m3 del gráfico anterior y por otro lado, los correspondientes a los ratios obtenidos tras la infiltración de los sensores AP2 y m3 junto con *Agrobacterium* transformadas con el plásmido que contiene la secuencia de la proteína p19. Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).



**Figura 19.** Diagrama de barras mostrando el valor de intensidades promedio (YFP en verde, DsRed en rojo) de los sensores AP2/AP2+p19 y los sensores m3/m3+p19 en *Nicotiana benthamiana* y su desviación estándar (barras de error). Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).

Al analizar los resultados de plantas infiltradas con el sensor m3 más p19 se observó un ratio similar a cuando se infiltraron únicamente con el sensor m3, indicando que con este sensor no existe fenómeno de silenciamiento (Figura 18). Cuando se realizó el mismo experimento con el sensor AP2 aún se registraron ratios mayores de uno, aunque menores que el ratio obtenido sin p19 (Figura 18). Este resultado apuntaba a que en los sensores AP2 se estaría generando de algún modo el silenciamiento de nuestro transgen.

Para ver si realmente la proteína p19 evitaba la caída de señal de la proteína fluorescente normalizadora, analizamos también las señales obtenidas por separado para cada módulo (Figura 19). De nuevo, no se observaron cambios en las intensidades de la YFP y de DsRed, en el sensor m3 en presencia o ausencia de la proteína p19. En el sensor AP2 se registró un claro aumento en la señal normalizadora (DsRed) en presencia de p19, que alcanzó niveles similares a los observados en el sensor m3, aunque también se observó un aumento en la señal YFP.

Tras este ensayo, inferimos que la adición de p19 modula el silenciamiento observado en el sensor AP2 pero a su vez también interfiere con el papel regulador del miRNA172 sobre el módulo sensor YFP. Es interesante destacar, que la única diferencia existente entre las dos construcciones, sensor AP2 y sensor m3, se encuentra en la secuencia que reconoce el miRNA172. En el sensor m3 se han mutado 7 de sus bases para evitar el reconocimiento del miRNA172. Estas mutaciones son silenciosas lo que significa que las proteínas YFP<sub>AP2</sub> y YFP<sub>m3</sub> son idénticas, descartando la posibilidad de que la diferencia en intensidades observada se deba a una posible estabilidad de las proteínas, aunque no se puede descartar una diferencia en la estabilidad de los mensajeros.

El hecho de que el silenciamiento de las construcciones sea mayor en presencia de altos niveles de miRNA172 sugiere que el silenciamiento observado pudiese depender directamente de miRNA172, y que los miRNA172 endógenos presentes en las hojas transformadas con el sensor AP2 podrían por sí solos, dirigir el silenciamiento. A día de hoy, no se ha encontrado en la bibliografía ningún ejemplo de miRNA que dirija directamente el silenciamiento epigenético de sus dianas, aunque este mecanismo si se ha descrito para tasiRNA (Agrawal *et al.*, 2003).

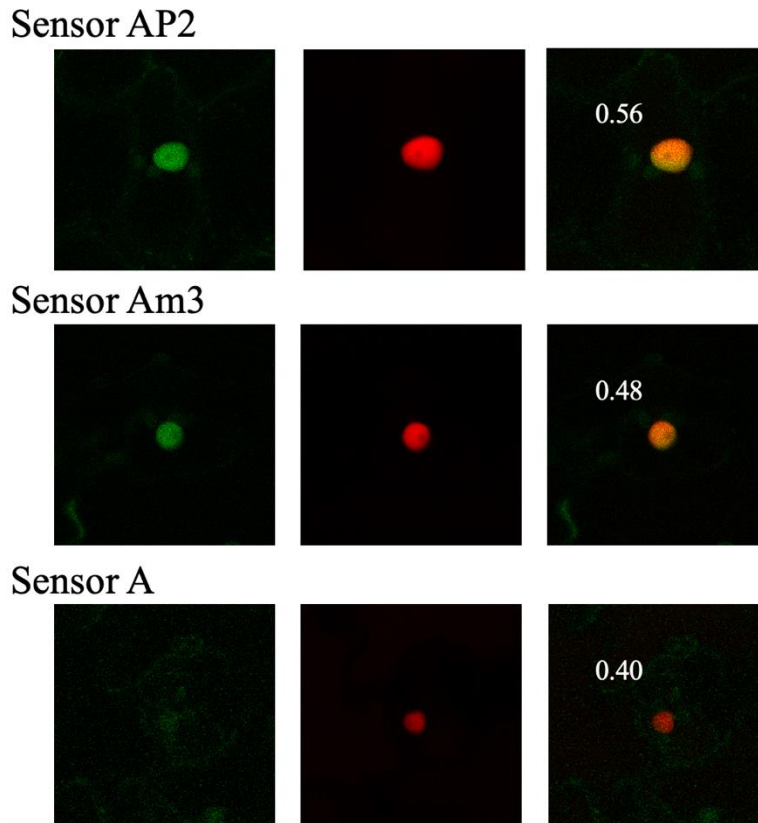
#### 4.2. CARACTERIZACIÓN DE SENSORES FLUORESCENTES PARA EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS DISTINTOS MIRNA172 SOBRE AP2 EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Para evaluar la posibilidad de que el miRNA172 pudiera de algún modo silenciar epigenéticamente sus dianas, se decidió hacer un ensayo de expresión transitoria en *Arabidopsis thaliana*, con los sensores AP2, Am3 y A en un fondo quintuple mutante del miRNA172 para descartar la actividad del miRNA172 endógeno sobre los sensores moleculares.

Los efectos de los distintos sensores fueron analizados por microscopía confocal sobre los cotiledones 4 días después de la infiltración.

Al igual que en *Nicotiana*, la coexpresión estequiométrica de las proteínas fluorescentes YFP y DsRed de los sensores empleados permitiría monitorizar la actividad del miRNA172 como una disminución de YFP en relación con la proteína fluorescente dsRED (ratio YFP/DsRed).

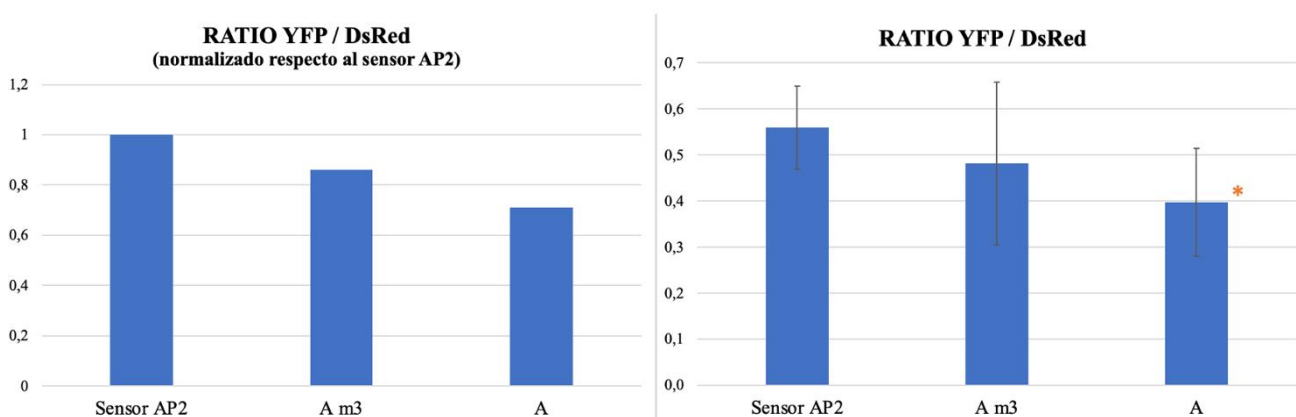
Tras la toma de imágenes con el microscopio confocal y el análisis de intensidades mediante el programa *Fiji*, se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 21).



**Figura 20. Análisis de fluorescencia de núcleos celulares de *Arabidopsis thaliana* a día 4 de la infiltración.** Se analizaron las intensidades de las proteínas fluorescentes YFP y DsRed por separado y el ratio YFP/DsRed para cada ensayo mediante el programa *Fiji*. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal a 20X, con un láser de excitación de 514 nm.

Como se puede observar (Figura 20), los núcleos de *Arabidopsis* son de menor tamaño que los núcleos de *Nicotiana*. Además, cabe mencionar que la técnica de transformación de las semillas de *Arabidopsis* todavía debe ser puesta a punto ya que se han encontrado numerosos problemas a lo largo del desarrollo del protocolo, con una baja tasa de transformación, por lo que estos experimentos deberían optimizarse para obtener unos resultados fiables.

En este experimento se mantuvieron las condiciones para la toma de imágenes establecidas en los experimentos de *Nicotiana*.



**Figura 21. Diagrama de barras representando los ratios de fluorescencia YFP/DsRed de los núcleos transformados de *Arabidopsis thaliana* y su desviación estándar (barras de error). Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).**

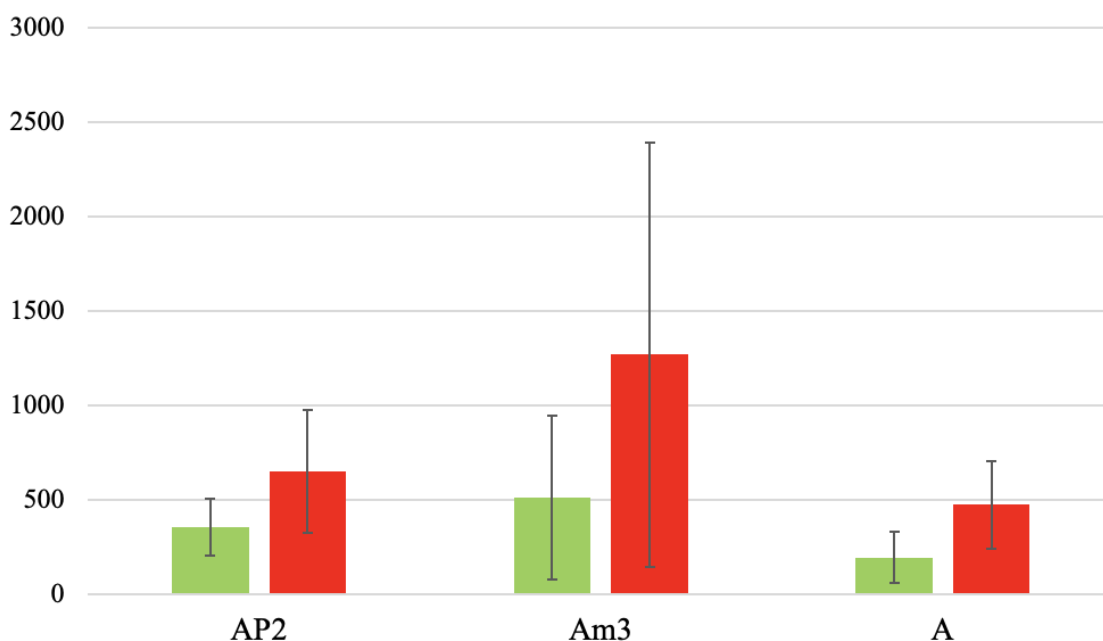
Al analizar los ratios obtenidos (Figura 21) se observó una disminución progresiva de sus valores siendo el ratio del sensor AP2 el más elevado (y muy parecido al del sensor m3 con mir172A (insensible)) y el sensor AP2 con mir172A el que presentó un ratio menor. Estos resultados indicarían de nuevo el funcionamiento esperado de estos sensores, con un descenso de la señal YFP al añadir el miRNA172.

Al analizar los datos crudos de intensidades por separado (Figura 22) se observó que la intensidad de ambos canales era mucho menor a la observada en *Nicotiana*, y además, la intensidad correspondiente al módulo sensor (YFP) era menor respecto a la señal del módulo normalizador (DsRed), en clara contraposición con lo observado en los ensayos de *Nicotiana* (Figura 17).

En el caso del sensor AP2, y al encontrarnos en un fondo quíntuple mutante del miRNA172, esperaríamos que la acción del miRNA172 endógeno fuese nula sobre el módulo sensor YFP, sin embargo, se detecta una disminución en su intensidad. Esto se puede deber a que las condiciones establecidas para la toma de imágenes fueron las mismas que se utilizaron en los experimentos de *Nicotiana* a partir del sensor m3. Debido a la baja eficiencia de este protocolo, no se pudieron establecer unas condiciones de toma de imágenes optimizadas. De todos modos, al trabajar en un fondo mutante miRNA172 si que se observó una mayor coherencia entre el sensor AP2 y el sensor Am3, observándose ratios parecidos entre ellos. Además, la presencia del miRNA172 en este fondo genético reflejó un esperado descenso en el ratio YFP/DsRed.

Por otro lado, en estos experimentos preliminares se volvió a observar una tendencia a la baja de la señal del módulo normalizador en presencia del miRNA172 (no significativa estadísticamente), sugiriendo un posible papel para este miRNA en el silenciamiento de sus dianas.

### INTENSIDAD YFP - DsRed



**Figura 22. Diagrama de barras mostrando el valor de intensidades promedio (YFP en verde, DsRed en rojo) de cada sensor analizado en *Arabidopsis thaliana* y su desviación estándar (barras de error). Se indica mediante un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre los datos y su control correspondiente (t-test).**

#### 4.3. GENERACIÓN DE UN NUEVO SENSOR PARA EL ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL MIRNA172 SOBRE AP2

El último objetivo de este TFG era iniciar la construcción de un nuevo sensor para detectar la actividad de los miRNA172 en planta que permitiera ser monitorizado “in vivo” y de manera no invasiva sobre la propia planta. Para esto se decidió utilizar el sistema RUBY (*He et al., 2020*), partiendo del plásmido UBQ-RUBY (Figura 14).

Este sistema cuenta con las 3 enzimas necesarias para la biosíntesis de betalaína: *CYP76AD1*, *DODA* y *Glucosyltransferase (GT)* (Polturak et al., 2019). Su expresión se encuentra dirigida por el promotor UBIQUITIN de maíz, muy utilizado en la sobreexpresión de genes en monocotiledóneas (Cornejo et al., 1993).

Los experimentos llevado a cabo por He et al., (2020) demostraron la capacidad de la construcción UBQ:RUBY para reconstruir funcionalmente la vía de biosíntesis de betalaína en *Arabidopsis*, confiriéndole un color rojo capaz de ser visualizado a simple vista sin necesidad de equipos especiales (He et al., 2020)



**Figura 23. Reconstrucción de la vía de biosíntesis de betalaína bajo el promotor UBQ en *Arabidopsis*.** A la izquierda, *Arabidopsis silvestre*. A la derecha, *Arabidopsis* transformada con la construcción UBQ:RUBY (He et al., 2020).

Con la finalidad de que esta construcción funcionase como un nuevo sensor molecular capaz de monitorizar la actividad del miRNA172, se llevó a cabo la introducción del sitio de unión del miRNA172 de *AP2* en dos de las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de betalaína: *DODA* y *GT*; convirtiéndolas así en dianas de este miRNA (*DODA*<sup>172</sup> y *GT*<sup>172</sup>).

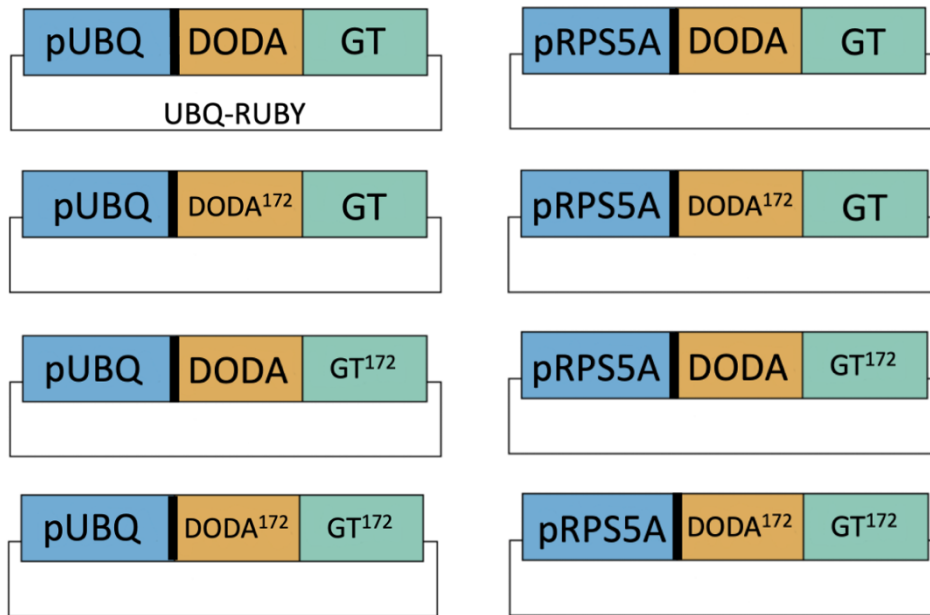
El modo de acción de este nuevo sensor consistiría en visualizar la disminución del color rojo debido a la regulación ejercida por el miRNA172 sobre las enzimas responsables de la síntesis de betalaína, ya que serían portadoras del sitio de unión del miRNA172 de *AP2*. Por otra parte, las enzimas que no posean este sitio de unión del miRNA172 serían insensibles a la presencia del miRNA, permitiendo establecer las condiciones y umbrales de detección en el experimento a partir de distintas construcciones.

El inicio del desarrollo de este nuevo sensor consistió en la amplificación por PCR de las secuencias de los enzimas *DODA* y *GT* mediante los cebadores reflejados en la Tabla 4, que se encargaron de introducir el sitio de unión del miRNA172 en el gen *AP2* silvestre en su secuencia. Por otra parte, la digestión del plásmido UBQ-RUBY con las distintas parejas de enzimas (Tabla 5) originaba la linealización del vector con la liberación de un fragmento correspondiente a los genes *DODA* y *GT* en cada caso.

La generación de las distintas construcciones (Figura 24) se llevó a cabo mediante el sistema de clonación *In-Fusion*, donde se fusionaba el vector linealizado junto con los dos fragmentos que forman parte de las secuencias de los genes *DODA*<sup>172</sup> y *GT*<sup>172</sup> en cada caso.

Con este método se consiguió restaurar el sistema RUBY con hasta dos módulos sensores sensibles a la actividad del miRNA172 maduro.

Por último, con el fin de optimizar el sistema en *Arabidopsis* en un futuro ensayo, se introdujo el promotor endógeno RPS5A en las distintas construcciones para dirigir la expresión del sistema RUBY. Las ventajas que ofrecería este nuevo promotor estarían reflejadas en una alta expresión constitutiva en todas las etapas del desarrollo, comenzando desde el óvulo e incluyendo las células meristemáticas (Tsutsui y Higashiyama, 2017).



**Figura 24. Construcciones generadas con la tecnología *In-fusion*.** Aparecen representadas las diferentes construcciones obtenidas por la combinación de los diferentes módulos: promotor (UBQ/RPS5A), DODA/DODA<sup>172</sup> y GT/GT<sup>172</sup>. El gen CYP76AD1 no aparece representado al encontrarse en todas las construcciones.

## 5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

A pesar de que estos estudios sean aún preliminares, los primeros resultados del estudio de la regulación de *AP2* por los diferentes *miRNA172* mediante sensores moleculares nos permite extraer una serie de conclusiones:

1. En los estudios llevados a cabo en *Nicotiana*, se observó que el sensor *AP2* es capaz de responder a la presencia de los diferentes *miRNA172* testados, confirmando su validez para detectar la presencia de dicho *miRNA*. Las diferencias observadas entre el sensor *AP2* y el sensor *m3* sugiere la existencia de un proceso de silenciamiento sobre el sensor *AP2*. El hecho de que el silenciamiento de las construcciones sea mayor en presencia de altos niveles de *miRNA172* sugiere una posible implicación de este *miRNA* en el silenciamiento epigenético de sus dianas.  
En esta línea, sería interesante cuantificar los niveles de transcripción de ambas proteínas para verificar su coexpresión estequiométrica. O bien, realizar el ensayo en plantas mutantes para los mecanismos de regulación epigenéticos para así descartar este nivel de regulación.
2. En los estudios llevados a cabo en *Arabidopsis*, al trabajar en un fondo mutante *miRNA172* si que se observó una mayor coherencia entre el sensor *AP2* y el sensor *Am3*, sugiriendo, al igual que en el caso anterior, un posible papel para el *miRNA172* en el silenciamiento de sus dianas. De nuevo, la presencia del *miRNA172* en este fondo genético reflejó un esperado descenso en el ratio *YFP/DsRed*, confirmando la validez del sensor para detectar la presencia de este *miRNA*.  
Sin embargo, la técnica de transformación de las semillas de *Arabidopsis* debe ser puesta a punto para optimizar la tasa de transformación y obtener así unos resultados fiables.
3. Por último, las construcciones del nuevo sensor molecular deben ser caracterizadas en futuros ensayos para analizar su utilidad. El desarrollo de esta herramienta permitirá al laboratorio su incorporación en futuros experimentos para evaluar el efecto de diferentes mutantes sobre la acción del *miRNA172*, así como su capacidad de movimiento a nivel intercelular como entre diferentes órganos (movimiento a larga distancia).



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 67(4), 657–685.
- Amasino, R. (2009). Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories. *Genome Biology*, 10(7), 228.
- Ameres, S. L., & Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(8), 475-488
- Aukerman, M. J., & Sakai, H. (2004). Erratum: Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its Apetala2-Like Target Genes (Plant Cell (2003) 15 (27302741)). *Plant Cell*, 16(2), 555.
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., Sato, S., Yanofsky, M. F., Kaufmann, K., Angenent, G. C., Bemer, M., & Ferrándiz, C. (2018). Genetic control of meristem arrest and life span in Arabidopsis by a FRUITFULL-APETALA2 pathway. *Nature Communications*, 9(1).
- Bologna, N. G., Mateos, J. L., Bresso, E. G., & Palatnik, J. F. (2009). A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *The EMBO journal*, 28(23), 3646-3656.
- Brand U, Grünewald M, Hobe M, Simon R. Regulación de la expresión de CLV3 por dos genes homeobox en Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2002; 129 : 565–575.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880), 1185-1190.
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, 303(5666), 2022-2025.
- Cornejo, M. J., Luth, D., Blankenship, K. M., Anderson, O. D., & Blechl, A. E. (1993). Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant molecular biology*, 23(3), 567-581.
- Danielson DC, Pezacki JP. Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein. *FEBS Lett.* 2013 Apr 17;587(8):1198-205. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.036. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23376479.
- Ding, J., Zhou, S., & Guan, J. (2012). Finding microRNA targets in plants: current status and perspectives. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 10(5), 264-275
- Fornara, F., de Montaigu, A. y Coupland, G. (2010). SnapShot: control de la floración en Arabidopsis. *Cell*, 141 (3), 550-550.
- Guleria, P., Mahajan, M., Bhardwaj, J., & Yadav, S. K. (2011). Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 9(6), 183-199.
- Iwakawa, H., & Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* 25, 651-665.

- He, Y., Zhang, T., Sun, H., Zhan, H., & Zhao, Y. (2020). A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. *Horticulture Research*, 7(1), 1–6.
- Hensel, L. L., Nelson, M. A., Richmond, T. A., & Bleecker, A. B. (1994). The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in Arabidopsis. *Plant physiology*, 106(3), 863-876.
- Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(1), 22-32.
- Jung, J. H., Seo, Y. H., Seo, P. J., Reyes, J. L., Yun, J., Chua, N. H., & Park, C. M. (2007). The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(9), 2736-2748.
- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making risc. *Trends in biochemical sciences*, 35(7), 368-376.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J., & Jürgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development*, 122(1), 87-96.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., ... & Chen, X. (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell*, 153(3), 562-574
- Lian, H., Wang, L., Ma, N., Zhou, C. M., Han, L., Zhang, T. Q., & Wang, J. W. (2021). Redundant and specific roles of individual MIR172 genes in plant development. *PLoS Biology*, 19(2), e3001044.
- Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., ... y Liu, J. (2017). Comparación sistemática de péptidos 2A para la clonación de múltiples genes en un vector policistrónico. *Informes científicos*, 7 (1), 1-9
- Martínez-Fernández, I., Menezes de Moura, S., Alves-Ferreira, M., Ferrándiz, C., y Balanzà, V. (2020). Identificación de jugadores que controlan la detención de meristemas aguas abajo de la vía FRUITFULL-APETALA2. *Fisiología vegetal*, 184 (2), 945-959.
- Mathieu, J., Yant, L. J., Mürdter, F., Küttner, F., & Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol*, 7(7), e1000148.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Cell*, 95(6), 805-815.
- Medford JI, Behringer FJ, Callos JD, Feldmann KA. (1992). Normal and abnormal development in the Arabidopsis vegetative shoot apex. *Plant Cell* 4: 631-43.
- Ó'Maoiléidigh, D. S., van Driel, A. D., Singh, A., Sang, Q., Le Bec, N., Vincent, C., ... & Coupland, G. (2021). Systematic analyses of the MIR172 family members of Arabidopsis define their distinct roles in regulation of APETALA2 during floral transition. *PLoS biology*, 19(2), e3001043.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *cell*, 110(4), 513-520.

- Samad, A. F., Sajad, M., Nazaruddin, N., Fauzi, I. A., Murad, A., Zainal, Z., & Ismail, I. (2017). MicroRNA and transcription factor: key players in plant regulatory network. *Frontiers in plant science*, 8, 565.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F. X., Jürgens, G. and Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 100: 635-644.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jürgens, G., & Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 100(6), 635-644.
- Song, L., Axtell, M. J., & Fedoroff, N. V. (2010). RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in Arabidopsis. *Current Biology*, 20(1), 37-41.
- Souret, F. F., Kastenmayer, J. P., & Green, P. J. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Molecular cell*, 15(2), 173-183.
- Spanudakis, E., & Jackson, S. (2014). The role of microRNAs in the control of flowering time. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 365–380.
- Stebbins GL. (1970). Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307-326.
- Steeves TA, Sussex IM. (1989). Patterns in Plant Development. *Nordic Journal of Botany* 11: 204-204.
- Tsutsui, H. y Higashiyama, T. (2017). Vectores pKAMA-ITACHI para la eliminación de genes mediada por CRISPR / Cas9 altamente eficiente en Arabidopsis thaliana. *Fisiología vegetal y celular* , 58 (1), 46–56.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669-687.
- Wang, J. W., Czech, B., & Weigel, D. (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. *Cell*, 138(4), 738-749.
- Weijers, D., Franke-van Dijk, M., Vencken, R. J., Quint, A., Hooykaas, P., & Offringa, R. (2001). An Arabidopsis Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. *Development*, 128(21), 4289-4299.
- Wend, S., Dal Bosco, C., Kämpf, M. M., Ren, F., Palme, K., Weber, W., Dovzhenko, A., & Zurbriggen, M. D. (2013). A quantitative ratiometric sensor for time-resolved analysis of auxin dynamics. *Scientific Reports*, 3, 1–7.
- Williams, L., Fletcher, J. C. (2005). Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(6), 582-586.
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics*, 42, 217-239.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell*, 138(4), 750-759.

Würschum, T., Groß-Hardt, R., & Laux, T. (2006). APETALA2 regulates the stem cell niche in the Arabidopsis shoot meristem. *The Plant Cell*, 18(2), 295-307.

Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., & Carrington, J. C. (2005). Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant physiology*, 138(4), 2145-2154.

Yamaguchi, A., & Abe, M. (2012). Regulation of reproductive development by non-coding RNA in Arabidopsis: to flower or not to flower. *Journal of plant research*, 125(6), 693-704.

Yang, L., Wu, G., & Poethig, R. S. (2012). Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in Arabidopsis. *Proceedings of the national academy of sciences*, 109(1), 315-320.

Zhang, B., & Chen, X. (2021). Secrets of the MIR172 family in plant development and flowering unveiled. *PLoS biology*, 19(2), e3001099

Zhu, Q. H., & Helliwell, C. A. (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *Journal of Experimental Botany*, 62(2), 487-495.