



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del  
Medi Natural

TREBALL FI DE GRAU EN BIOTECNOLOGIA

Curs 2020/2021

**Estudi de la redundància funcional d'un  
clado de factors de transcripció bHLH  
d' *Arabidopsis thaliana***

Ana Puertes Espadas

Tutora externa: Patricia Ballester Fuentes

Tutor acadèmic: José Javier Forment Millet

A València, juliol de 2021

**Títol:** Estudi de la redundància funcional d'un clado de factors de transcripció bHLH d'*Arabidopsis thaliana*.

**Resum:** les proteïnes bHLH són una superfamília de factors de transcripció en plantes que en *Arabidopsis thaliana* controlen una diversitat de processos que van des de la proliferació cel·lular fins a l'establiment del llinatge cel·lular. Entre les proteïnes d'esta família es troben les HECATE, codificades per 3 gens diferents (*HECATE1*, *HECATE2* i *HECATE3*), que estan involucrades en el desenvolupament del septum, del tracte de transmissió i de l'estigma. Combinacions de distint ordre entre els mutants corresponents en HECATE causen un grau variable d'infertilitat en les plantes. La proteïna INDEHISCENT (IND) també pertany a este grup i participa en la regulació de la dehiscència del fruit, necessària per a la dispersió de les llavors contingudes en el seu interior.

En altres espècies es va estudiar la funció dels gens homòlegs a *HECATE3* i es va observar que quan es mutaven, es produïen defectes en la formació de teixits transmissors (tracte i estigma) i en la dehiscència del fruit, però també provocava la indehiscència de les anteres, per la qual cosa es va concloure que este factor participava de manera activa en la seua obertura, funció d'alguna manera relacionada amb la que tenia IND en fruits d'*Arabidopsis thaliana* però no observada en les anteres. Així doncs, va sorgir la hipòtesi d'una possible redundància més ampla dels gens *HECATE* junt amb el gen *INDEHISCENT*, pròxims filogenèticament, en la dehiscència de les anteres d'*Arabidopsis thaliana*, i este estudi és precisament el que es va a dur a terme en aquest treball. Per a això, es procedirà a la identificació d'un quàdruple mutant *hec1hec2hec3ind*, genotipant una població segregant, amb l'objectiu d'estimar la redundància funcional d'estos 4 factors de transcripció mitjançant la caracterització fenotípica dels mateixos. A més a més, per a continuar i reforçar l'anàlisi d'aquest treball, es va a crear la construcció HEC3p:HEC3(CDS):GR, mitjançant la tecnologia GoldenBraid, amb l'objectiu de generar plantes transgèniques i observar les conseqüències de la seua expressió en elles.

**Abstract:** the bHLH proteins are a superfamily of transcription factors in plants that in *Arabidopsis thaliana* control a variety of processes. Among the proteins of this family are HECATE, encoded by 3 different genes (*HECATE1*, *HECATE2* and *HECATE3*), which are involved in the development of the septum, the transmission tract and the stigma. Different order combinations between the corresponding HECATE mutants cause a variable degree of infertility in plants. The INDEHISCENT (IND) protein also belongs to this group and participates in the regulation of fruit dehiscence, necessary for the dispersion of the seeds contained inside.

In other species, the function of genes homologous to *HECATE3* was studied and it was observed that when they were mutated, defects were produced in the formation of transmitter tissues (tract and stigma) and in the dehiscence of the fruit, but also induces the indehiscence of anthers, so it was concluded that this factor participated actively in their opening, a function in some way related to which had IND in fruits of *Arabidopsis thaliana* but not observed in anthers. Thus, the hypothesis arose of a possible broader redundancy of the *HECATE* genes together with the gene *INDEHISCENT*, which are phylogenetically close, in the dehiscence of anthers in *Arabidopsis thaliana*, and this study is precisely the one that will be carried out in this work. To do this, we will proceed to the identification of a quadruple mutant *hec1hec2hec3ind*, genotyping a segregating population in order to estimate the functional redundancy of these 4 transcription factors through their phenotypic characterization. In addition, to continue and reinforce the

analysis of this work, the construction pHEC3:HEC3(CDS):GR will be created, using GoldenBraid technology, with the aim of generating transgenic plants and observing the consequences of their expression in them.

**Paraules clau:** genotipat; factor de transcripció; clado; *Arabidopsis thaliana*; antera; dispersió; planta transgènica; ADN; *Escherichia coli*.

**Keywords:** genotyping; transcription factor; clade; *Arabidopsis thaliana*; anther; dispersion; transgenic plant; DNA; *Escherichia coli*.

**Autora del TFG:** Ana Puertes Espadas

**Tutor acadèmic:** José Javier Forment Millet

**Treball no confidencial**

**A València, juliol de 2021**

*A Cristina, per l'oportunitat.*

*A Patri, per la confiança.*

*A David, per la reciprocitat.*

*Família, amics, amigues, gràcies per estar sempre.*

*Per les dones que han fet, fan i faran ciència.*

# ÍNDIX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	1
<b>1.1 Les flors en <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	1
1.1.1 L'òrgan reproductor masculí .....	1
1.1.2 L'òrgan reproductor femení.....	2
<b>1.2 Desenvolupament del gineceu en <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	3
1.2.1 Els gens <i>HECATE</i> .....	4
1.2.2 El gen <i>INDEHISCENT</i> .....	5
<b>1.3 Antecedents del projecte</b> .....	5
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	7
<b>3. MATERIALS I MÈTODES</b> .....	8
<b>3.1 Extracció d'ADN de mostres vegetals</b> .....	8
<b>3.2 Genotipat d'<i>HECATE</i> i <i>INDEHISCENT</i></b> .....	9
3.2.1 <i>HECATE</i> .....	9
3.2.2 <i>INDEHISCENT</i> .....	11
<b>3.3 Anàlisi fenotípic de plantes mutants</b> .....	12
<b>3.4 Construcció <i>HEC3p:HEC3(CDS):GR</i> mitjançant GoldenBraid</b> .....	13
3.4.1 Domesticació al programa GoldenBraid .....	14
3.4.2 Amplificació d' <i>HEC3p:HEC3(CDS)</i> .....	15
3.4.3 Amplificació del GR .....	16

3.4.4 Clonatge i transformació en <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.4.5 Recuperació del plasmidi (mini-prep) .....	17
3.4.6 Testat de la construcció creada.....	17
<b>3.5 Treball i condicions d'hivernacle.....</b>	<b>18</b>
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Genotipat d'<i>HECATE</i> i <i>INDEHISCENT</i> en les línies vegetals.....</b>	<b>19</b>
4.1.1 Regenotipat de la nova generació de la mostra 42.....	20
<b>4.2 Caracterització fenotípica d'<i>hec1hec2hec3ind</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>4.3 Construcció HEC3p:HEC3(CDS):GR .....</b>	<b>26</b>
4.3.1 Projeccions futures.....	30
<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>32</b>
<b>6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.....</b>	<b>33</b>

## ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Diagrama d'una antera en secció transversal .....	1
Figura 2. Regió del tabic i de l'estomium d'una antera en <i>Arabidopsis</i> .....	2
Figura 3. Estructura del fruit silvestre .....	3
Figura 4. Arbre dels gens <i>INDEHISCENT/HECATE3</i> en plantes amb llavors que mostren duplicació en <i>Brassicaceae</i> .....	6
Figura 5. Representació esquemàtica del procediment a realitzar per a la clonació d'HEC3p:HEC3(CDS):GR, mitjançant GoldenBraid .....	14
Figura 6. Genotipat d' <i>HECATE1</i> .....	21
Figura 7. Genotipat d' <i>HECATE2</i> .....	21
Figura 8. Genotipat d' <i>HECATE3</i> .....	22
Figura 9. Amplificació d' <i>INDEHISCENT</i> .....	22
Figura 10. Genotipat d' <i>INDEHISCENT</i> .....	22
Figura 11. Fotografies de tota l'estructura vegetal d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	23
Figura 12. Fotografies d'inflorescències d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
Figura 13. Fotografies florals d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en l'etapa de pre-antesi .....	24
Figura 14. Fotografies florals d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en l'etapa d'antesi .....	24
Figura 15. Fotografies florals d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en l'etapa de post-antesi .....	25
Figura 16. Fotografies de la zona apical d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
Figura 17. Electroforesi del testat de la clonació del GR al plasmidi UPD <sub>2</sub> amb els enzims XhoI i BsaI .....	27
Figura 18. Electroforesi del testat de la clonació d'HEC3p:HEC3(CDS) al plasmidi UPD <sub>2</sub> amb els enzims BsaI i Eco321 .....	27
Figura 19. Electroforesi del testat de la clonació d'HEC3p:HEC3(CDS) al plasmidi UPD <sub>2</sub> amb els enzims EcoRI i HindIII per a les colònies 6, 16 i 17. ....	28
Figura 20. Representació esquemàtica de la construcció aconseguida mitjançant GoldenBraid .....	29
Figura 21. Representació esquemàtica del resum final de la clonació d'HEC3p:HEC3(CDS):GR, mitjançant GoldenBraid .....	30

## ÍNDIX DE TAULES

<b>Taula 1. Material vegetal utilitzat</b> .....	8
<b>Taula 2. Relació de referències amb els gens <i>HECATE</i> i <i>INDEHISCENT</i></b> .....	9
<b>Taula 3. Informació encebadors utilitzats per a <i>HECATE</i></b> .....	9
<b>Taula 4. Programes de PCR utilitzats per a genotipar <i>HECATE</i></b> .....	10
<b>Taula 5. Informació encebadors utilitzats per a <i>INDEHISCENT</i></b> .....	11
<b>Taula 6. Informació encebadors utilitzats per a l'amplificació d'HEC3p:HEC3(CDS)</b> .....	15



## ABREVIACIONS

**FAM:** compost amb formaldehid, àcid acètic i metanol

**GR:** promotor del gen del glucocorticoides

**HEC3p:** promotor d'*HECATE3*

***hec123:*** *hec1hec2hec3*

***hec123ind:*** *hec1hec2hec3ind*

***hec2 +/-:*** heterocigosi per al gen *HECATE2*

***ind +/-:*** heterocigosi per al gen *INDEHISCENT*

**mut:** mutant

**pb:** pars de bases

**pUPD<sub>2</sub>:** plasmidi UPD<sub>2</sub>

**T<sub>anellament</sub> :** temperatura d'anellament

**T<sub>extensió</sub> :** temperatura d'extensió

**WT:** wild type

**x:** cicles

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1 Les flors en *Arabidopsis thaliana*

Les flors són l'estructura reproductiva de les angiospermes, com és el cas d'*Arabidopsis thaliana*. Es componen de 4 tipus distints d'òrgans que, d'exterior a interior, són: sèpals, pètals, estams (l'òrgan reproductor masculí) i carpels. Es desenvolupen en quatre anells concèntrics o verticils. La identitat d'òrgan floral es basa en l'acció conjunta de quatre classes de factors de transcripció específics de la flor (Robles i Pelaz, 2005; Prunet et al., 2009).

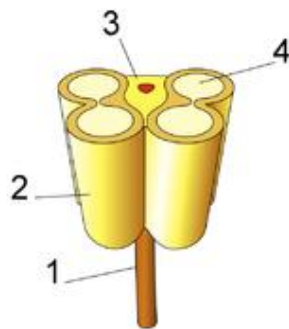
### 1.1.1 L'òrgan reproductor masculí

En els estams es poden diferenciar dos regions. Una d'elles, la superior més ampla, s'anomena antera, i conté el pol·len, i l'altra està formada per filaments, que comprén la vasculatura, que s'estén per assegurar-se que el pol·len s'allibere lluny de la flor. Els filaments sostenen les antereres des del centre de la flor per a augmentar les possibilitats que un pol·linitzador fregue les antereres i recol·lecte el pol·len.

Una antera en *Arabidopsis* consta de dos parts distingibles i contigües, anomenades teques, unides per una zona anomenada connectiu, que és per on s'uneix al filament. Cada antera conté un o dos sacs pol·línics que s'estenen al llarg de tota la seua longitud.

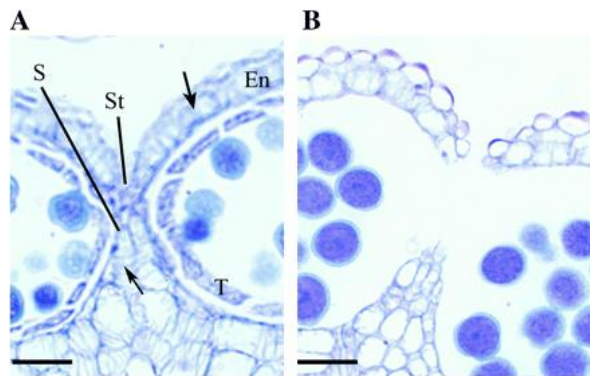
En un tall transversal d'una antera jove (**Figura 1**) es troben, de fora cap a dins, les següents estructures:

- Epidermis, prima i continua.
- Teixit mecànic o endoteci, capa fibrosa sobre els cantons externs dels sacs pol·línics
- De 2 a 4 estrats o capes parietals de cèl·lules parenquimàtiques, que degeneren ràpidament
- Tapet o teixit nutricional
- Arquespori, que constitueix cada sac pol·línic



**Figura 1. Diagrama d'una antera en secció transversal.** 1: Filament; 2: Teca; 3: Connectiu (vasos conductors en roig); 4: Sac pol·línic (també anomenat esporangi)

L'alliberació del pol·len (**Figura 2**) requereix temps i un desenvolupament coordinat entre l'antera i la flor. La dehiscència de l'antera és un procés que permet la dispersió del pol·len, i en ell participen múltiples etapes (Wilson et al., 2011; Goldberg et al., 1993; Smyth et al., 1990).



**Figura 2. Regió del tabic i de l'estomium d'una antera en *Arabidopsis*.** (A) La regió de l'estomium després de l'alliberació de les microesposes; en el endoteci es poden observar bandes d'engrossiment secundari (fletxes). (B) La regió de l'estomium en la dehiscència de l'antera, després de la lisi del tabic i l'estomium. En: endoteci; St: estomium; S: tabic. Bar = 50µm (Wilson et al., 2011)

Durant el procés, l'acumulació de lignina en l'endoteci de les antereres permet l'engrossiment secundari de la paret. Degut a açò, es produeix la lisi del septe i de l'estomium, que completa la dehiscència, i amb ella, l'eixida dels grans de pol·len (Dai et al., 2019).

### 1.1.2 L'òrgan reproductor femení

El gineceu és la part femenina de les flors en les plantes angiospermes, i l'últim verticil en una flor completa. El formen els carpels i sobre ells es produeixen els òvuls que engloben els gamets femenins.

En *Arabidopsis thaliana*, el gineceu està format per 2 carpels fusionats. Durant el seu desenvolupament es distingeixen 3 eixos diferents:

- L'eix medial-lateral: amb el meristem del marge del carpel i les vàlvules
- L'eix adaxial-abaxial: engloba tot el que creix dins i fora del gineceu, respectivament
- L'eix apical-basal: es troben l'estigma, l'estil, l'ovari i el ginòfor

Es tracta d'una estructura biològica molt complexa, ja que per a la seua correcta formació i funcionalització es requereix d'identitats específiques de cada un dels teixits que el formen (Zúñiga-Mayo et al., 2019).

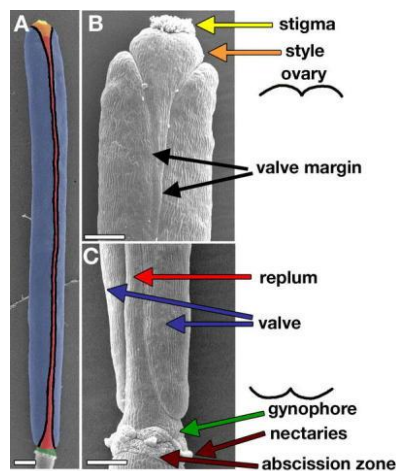
Els seus teixits interns posseeixen característiques meristemàtiques i són denominades meristema del marge del carpel (CMM), perquè estan ubicats en els marges dels carpels i generen els teixits 'marginals' del gineceu (placenta, òvuls, tabic, tracte transmissor, estil i estigma) (Reyes-Olalde et al., 2013).

La seua funció, abans de convertir-se en fruit, és albergar i protegir un o diversos òvuls, atraure el pol·len a l'estigma apical, induir la germinació del pol·len i guiar els conductes pol·línics a través del tracte transmissor cap als òvuls (Larsson et al., 2013).

Els teixits de l'estigma en l'apex del carpel estan adaptats per a ser els responsables de la captura del pol·len transportat per vectors (insectes, aus...). El carpel, a més de protegir els òvuls, també participa en els diferents mecanismes selectius que actuen sobre el pol·len, com és la autocompatibilitat.

Després de la fertilització, els teixits del carpel experimenten certs canvis de desenvolupament addicional per a convertir-se en el fruit, estructura que protegeix les llavors, que posteriorment contribuirà a la seua dispersió (Scutt et al., 2006).

El fruit d'*Arabidopsis thaliana* (**Figura 3**) es desenvolupa a partir del gineceu fertilitzat per formar una silicona o baina de llavors, que es seca i que s'obri en la maduresa, alliberant les llavors.



**Figura 3. Estructura del fruit silvestre.** (A) SEM d'un fruit Landsberg erecta (Ler) en l'etapa 17. El fruit ha sigut colorejat falsament per a distingir les diferents parts (...). A la part superior del fruit, l'estigma és de color groc i l'estil és taronja. La gran part central del fruit és l'ovari, que consta de les valves (blau) o parets de la baina, el replum (roig) o cresta central que queda adherida a la planta després de la dehiscència, i els marges valvulars (negre) on es troben les valves. El ginòfor (verd) és el xicotet entrenuc a la base del fruit per damunt de la zona d'abscissió de l'òrgan floral i els nectaris. (B) Tancament SEM de la part superior d'un fruit Ler en l'etapa inicial 17 on les diferents parts del fruit estan indicades a,b fletxes (Roeder i Yanosfky, 2006)

Aquest procés de dehiscència comporta la diferenciació de tipus de cèl·lules especialitzades, que provoca la separació cel·lular i el posterior alliberament de les llavors. A més a més, es requereix d'una coordinació adequada entre events moleculars i bioquímics perquè es duga a terme de manera eficient (Ferrándiz, 2002).

## 1.2 Desenvolupament del gineceu en *Arabidopsis thaliana*

El desenvolupament del gineceu en *Arabidopsis thaliana* està controlat per gran quantitat de gens i hormones. Per exemple, perturbacions i alteracions en la homeostasi de les auxines tenen efectes importants sobre la morfologia del gineceu. De la mateixa manera, mutacions en els gens relacionats amb estes hormones també provoquen malformacions en l'òrgan reproductor femení (Cheng et al., 2006; Okada et al., 1991; Benjamins et al., 2001; Sessions et al., 1997; Sessions i Zambryski, 1995).

No obstant això, són molts altres gens no relacionats amb aquestes hormones els que també estan involucrats en el desenvolupament del gineceu i, per tant, és necessària una regulació coordinada i eficient dels mateixos per a dur a terme un progrés competent d'aquesta estructura.

Existeix tota una red genètica que està involucrada en la formació i progrés del gineceu. És per això que no es pot deixar d'explicar la família proteica bHLH en aquesta espècie, que tenen un paper cabdal en aquesta estructura.

Les proteïnes bàsiques / hèlix-loop-hèlix (bHLH) són una superfamília de factors de transcripció que s'uneixen com a dímers a llocs diana de l'ADN específics. S'han identificat 147 gens que les codifiquen, per això s'ha convertit en una de les famílies de factors de transcripció més grans en *Arabidopsis thaliana*.

Estan definides pel domini bHLH, que consta d'aproximadament 60 aminoàcids amb dos regions funcionalment diferents. La regió bàsica, ubicada en l'extrem N-terminal, és la responsable de la unió a l'ADN, i la regió HLH, ubicada en l'extrem C-terminal, és l'encarregada de la dimerització (Toledo-Ortiz et al., 2003; Murre et al., 1989; Ferré-D'Amaré et al., 1994).

SPATULA (SPT) i ALCATRAZ (ALC) són dos proteïnes englobades en aquest grup. Participen en el desenvolupament del tabic, estil i estigma en la flor, i en la zona de deshiscència del fruit, respectivament.

D'altra banda, la família genètica *NGATHA* (*NGA*), que interacciona funcionalment amb les proteïnes bHLH, està relacionada amb el procés de proliferació cel·lular d'òrgans laterals aeris, com són les fulles o les flors. En alguns estudis s'ha observat que el quàdruple mutant *nga* careixia d'estil i estigma (Lee et al., 2015; Trigueros et al., 2009), i també que modulen l'homeostasi de les cèl·lules mare en el meristem apical del brot (Gaillochet et al., 2018).

### 1.2.1 Els gens *HECATE*

*HECATE1* (*HEC1*), *HECATE2* (*HEC2*) i *HECATE3* (*HEC3*) són gens que codifiquen factors de transcripció bHLH, que estan involucrats principalment en el desenvolupament del tracte transmissor, estigma i *septum*, en *Arabidopsis thaliana*. *HECATE1* es troba al cromosoma 5, conté 1266pb i consta de 2 exons. *HECATE2* es localitza al cromosoma 3, conté 1423pb i té 1 exó. *HECATE3* està al cromosoma 5, té 1006pb i consta d'1 exó (informació de GenBank).

La sobreexpressió de qualsevol d'aquests gens provoca una morfologia en forma d'alfiler. Contràriament, diferents combinacions de mutacions en els gens *HECATE* indueixen diferents nivells d'infertilitat en la planta, així com també defectes en el tabic, tracte transmissor, estigma i en el creixement dels tubs pol·línics.

Els factors *HECATE* poden dimeritzar amb SPATULA (SPT) en un sistema de dos híbrids de rent, que indica que aquests factors de transcripció treballen conjuntament (Gremsky et al., 2007).

També es sap que els *HECATE* participen en la modulació del temps de floració, i que açò implica la regulació directa d'*NGATHA1*. A més a més, com també ho fa *NGATHA*, *HECATE* regula el comportament cel·lular en el meristem apical del brot (*SAM*) (Gaillochet et al., 2017).

Tant *SPT* com *HEC* estan controlats negativament per *ETTIN* (*ETT*), el factor de resposta a auxines, la qual cosa impedeix l'expressió d'estos gens en les regions abaxials durant el desenvolupament del gineceu (Gaillochet et al., 2018).

### 1.2.2 El gen *INDEHISCENT*

La dispersió de les llavors és un procés molt important en el cicle de vida d'una espècie vegetal. Aquesta acció és l'encarregada d'assegurar la supervivència de les generacions futures. En *Arabidopsis thaliana*, el gen *INDEHISCENT* (*IND*), que pertany a la família bHLH, és el responsable principal de dur a terme aquesta funció. *IND* es localitza al cromosoma 4, té 1533pb i consta d'1 exó (información de GenBank).

Aquest també provoca l'especificació dels marges de la valva (Ferrándiz et al., 2002). A més a més, la proteïna *INDEHISCENT* (*IND*) és crucial perquè és la responsable de la formació d'un mínim d'auxina en la zona de dehiscència del fruit en l'etapa 17B, i aquest mínim d'auxina és necessari per a l'especificació de la capa de separació (Sorefan et al., 2009; Balanzà et al., 2016; Ferrándiz, 2002). També participa en la diferenciació dels 3 tipus de cèl·lules necessàries per a la dehiscència del fruit, i és el principal responsable de controlar la lignificació de les cèl·lules del marge. (Liljegren et al., 2004).

*IND* interactua amb *SPATULA* per a controlar l'expressió del gen *PINOID* (*PIN*), unint-se al promotor i reprimint la seua expressió, i de *WAG2*, en aquest cas de manera positiva (Alvarez i Smyth, 1999; Girin et al., 2011; Heisler et al., 2001; Sorefan et al., 2009).

D'altra banda, *IND* també coopera amb *ETT*, i junts controlen la polaritat en l'àpex del gineceu mitjançant la regulació directa de l'expressió del gen *PID*, el mateix que regulaven *SPT-IND* (Kuhn et al., 2019).

### 1.3 Antecedents del projecte

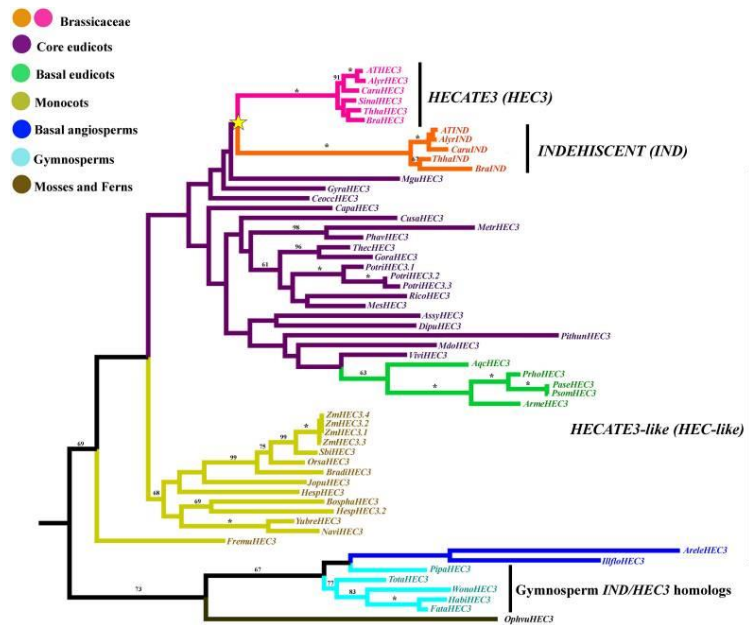
En espècies diferents a *Arabidopsis*, concretament en *Nicotiana benthamiana*, es va realitzar un estudi dels gens homòlegs d'*HECATE*, entre altres, amb l'objectiu d'analitzar la funcionalitat d'aquests factors de transcripció en aquesta espècie. En les investigacions, *NibeHEC1* i *NibeHEC2* (gens homòlegs d'*HEC1* i *HEC2*, respectivament) van suggerir que no eren importants en el desenvolupament del gineceu, mentre que *NibeHec3* sí que ho era (gen homòleg d'*HEC3*). Aquest s'ha observat que s'expressa predominantment durant el desenvolupament de la flor i es manté expressat en la zona de dehiscència de l'estil, l'estigma, i també de les anteres. Aquesta última funcionalitat pareix estar relacionada amb la d'*IND* en el fruit d'*Arabidopsis thaliana*, però no s'ha observat en les anteres de la mateixa. *IND* no consta d'ortòlegs en *Nicotiana*, és un paràleg específic de *Brassicaceae* (Ortiz-Ramírez et al., 2018).

A més a més, en altra espècie també s'ha observat que una mutació en un gen bHLH relacionat, *RIAI*, provoca la indehiscència de les anteres. Aquesta és una contemplació que ha descrit un company del laboratori, que està treballant en aquesta espècie, però aquesta informació no s'ha pogut referenciar ni detallar ja que l'estudi encara no està complet ni publicat.

La dehiscència de les anteres és un procés important en els estams madurs. De no dur-se a terme, l'espècie vegetal sofriria esterilitat. Per tant, la regulació i coordinació dels gens que participen en aquesta funció és crucial per a la supervivència.

Aquest procés està bastant conservat en diferents espècies de plantes. *Arabidopsis thaliana* mostra un procés de dehiscència similar al de les solanàcies, a l'arròs monocotiledònia i a la dacsa (Wilson et al., 2011).

Es disposen de pocs anàlisi filogenètics d'*HECATE* i *IND*, però aquells disponibles suggereixen que *HEC1/HEC2* i *HEC3/IND* formen dos clados separats que van divergir abans de la diversificació de les plantes amb flors (**Figura 4**) (Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017)



**Figura 4.** Arbre dels gens *INDEHISCENT/HECATE3* en plantes amb llavors que mostren duplicació en *Brassicaceae* (estrella groga) (Pabón-Mora et al., 2014).

*IND* posseeix una extensa similitud de seqüència amb els gens *HECATE* en el domini bHLH i en 30 aminoàcids en posició N-terminal. A més a més, cap té un glutamat en la posició 13 en el domini bàsic, que és important per a la unió a l'ADN. Per tant, es podria considerar a *HECATE* i *IND* com una subfamília de les bHLH, degut a la seua semblança estructural (Ellenberg et al., 1994; Ma, 1994).

Amb tota aquesta informació filogenètica i funcional, s'ha suggerit una possible redundància més ampla d'*HECATE* junt a *IND* en la dehiscència de les anteres d'*Arabidopsis thaliana*. Aquest estudi és el que s'exposa en el present document, i és el que defineix aquest treball de final de grau.

## 2. OBJECTIUS

Analitzar la redundància funcional dels gens *HECATE* i *INDEHISCENT* en la dehiscència d'anteres en *Arabidopsis thaliana*:

- Búsqueda del quàdruple mutant *hec1hec2hec3ind* per tal d'estudiar el seu possible paper en la dehiscència de les anteres
- Obtenció de la construcció HEC3p:HEC3(CDS):GR mitjançant la tecnologia GoldenBraid per a identificar en estudis posteriors gens regulats per *HECATE3*



### 3. MATERIALS I MÈTODES

Temps abans de la meua incorporació al laboratori, es van dur a terme diferents encreuaments de línies vegetals per tal d'obtindre, almenys, una mostra que permetera aconseguir un quàdruple mutant i, amb això, un dels nostres objectius. Així, aquests són els encreuaments realitzats, i sobre els quals es van treballar.

Encreuament 1: (*hec1hec3* x *ind +/-*) x *hec1hec2hec3*. Es van obtindre 44 plantes resultat d'aquest encreuament, i al seu conjunt se li va anomenar línia 1. Cada una va rebre una numeració (1-44)

Encreuament 2: *hec1hec3* x *ind +/-*. En aquest cas, se'n van obtindre 32, i al grup se li va anomenar línia 2. Cada una va rebre una numeració (1-32).

Cal mencionar també el material vegetal usat durant el procediment (**taula 1**).

**Taula 1. Material vegetal utilitzat**

GENOTIP	ECOTIPO	REFERÈNCIA
WT (Columbia-0)	Columbia	Rédei, 1962
<i>ind</i>	Landsberg (Ler)	Liljegren et al., 2014
<i>hec1hec2hec3</i>	Columbia	Schuster et al., 2014

#### 3.1 Extracció d'ADN de mostres vegetals

A partir de la mostra aconseguida de cada una de les línies germinades a l'hivernacle (veure condicions a l'apartat 3.5), aproximadament de 10g (una fulla jove), es va procedir a l'extracció del material genètic de les mateixes, ja que anaven a ser usades posteriorment. A més d'aquestes, també es va extraure l'ADN d'altres mostres que s'anaven a usar, per als controls, tant positius com negatius, dels procediments.

Primerament, als eppendorfs que contenien la mostra de fulla de cada planta es van introduir dos/tres boles de vidre i es van congelar amb nitrogen líquid. Després, es van portar a l'homogeneïtzador de mostres MM400 (Retsch), i es va usar el programa 2, durant 45s a una freqüència de 30 s<sup>-1</sup>.

A continuació, per a cada eppendorf, es va dur a terme el següent protocol:

1. Afegir 400µL de tampó d'extracció\* i vortexar durant 5 segons (en aquest pas les mostres es podien deixar a temperatura ambient durant 1 hora, fins a tindre les mostres extretes)
2. Centrifugar 2-4 minuts a 13.000rpm
3. Transferir 300µL del sobrenadant a un tub nou evitant agafar el sediment
4. Afegir 300µL d'isopropanol, mesclar i deixar a temperatura ambient durant 2 minuts
5. Centrifugar 5 minuts a 13.000rpm per a recollir l'ADN
6. Eliminar el sobrenadant vertint l'eppendorf, fer una centrifuga curta i, amb l'ajuda d'una pipeta, eliminar la resta de líquid
7. Assecar el sediment
8. Afegir 100µL d'H<sub>2</sub>O i agafar 1µL per 25-30µL de reacció de PCR

\*Tampó d'extracció: 200mM Tris-HCl pH 7.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS

### 3.2 Genotipat d'*HECATE* i *INDEHISCENT*

Per tal de conèixer la informació genètica continguda en cada un dels gens que es volien estudiar (*HEC1*, *HEC2*, *HEC3*, *IND*), es va procedir al genotipat dels mateixos, de totes i cada una de les mostres d'ADN que es van extraure (de la línia 1 i de la línia 2). Aquest procediment es va dur a terme mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per al cas dels *HECATE*, i amb una digestió posterior per a *INDEHISCENT*. Les condicions, materials i reactius es desenvolupen a continuació.

La informació de cada encebador, incloent el programa de PCR, es va extraure de les referències de la **taula 2**.

**Taula 2. Relació de referències amb els gens *HECATE* i *INDEHISCENT***

<i>HEC1</i> i <i>HEC3</i>	Gremsky et al., 2007
<i>HEC2</i>	Schuster et al., 2014
<i>IND</i>	Liljegren et al., 2014

#### 3.2.1 *HECATE*

Per a poder distingir l'al·lel WT o mutant de cada gen *HECATE* es van dur a terme dos amplificacions de manera independent.

A la **taula 3** s'adjunten els noms dels encebadors per a cada gen i al·lel, les seqüències nucleotídiques, així com també la  $T_m$  de cada un.

**Taula 3. Informació encebadors utilitzats per a *HECATE***

		NOM COMERCIAL	SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA	$T_m$ (°C)
<i>HEC1</i>	BANDA WT	oKG156	5' ACCACAACAACACTTACCCTTTTC 3'	55,8
		oKG157	5' GTTCCACACCCTTTCATAACCACT 3'	57,2
	BANDA MUTANT	oKG156	5' ACCACAACAACACTTACCCTTTTC 3'	55,8
		GabiT	5' CCCATTTGGACGTGAATGTAGACA 3'	57,8
<i>HEC2</i>	BANDA WT	HEC2 R	5' ATGCTTTCTGAATCCAACACCC 3'	55,7
		HEC2 F (WT)	5' CTCACAAAACCTTAAGTAGATGTCTGA 3'	54,6
	BANDA MUTANT	HEC2 R	5' ATGCTTTCTGAATCCAACACCC 3'	55,7
		HEC2 F (mut)	5' CCGACTCTTTAATTAAGTACTGACTC 3'	55,5
<i>HEC3</i>	BANDA WT	ILC-X3	5' TGCACCATTACTCACACATTATAGCA 3'	56,4
		ILC-8	5' TACATATAAGCATCGCTCAAGC 3'	54,9
	BANDA MUTANT	ILC-3	5' TGCACCATTACTCACACATTATAGCA 3'	56,4
		LBb3	5' ACCCAGCGTGGACCGCTTGGTG 3'	66,7

Els oligonucleòtids usats procedeixen de la casa comercial IDT (<https://eu.idtdna.com/pages/>).

Per a la reacció de PCR (25µL) per a cada mostra es va usar: H<sub>2</sub>O, 5X Green GoTaq® (PROMEGA), 10µM dNTPs (PROMEGA), 25mM MgCl<sub>2</sub>\* (25mM)(PROMEGA), 20µM de cada encebador (**Taula 3**), GoTaq® G2 Flexi (PROMEGA) com a polimerasa, i 2 µL d'ADN.

\*Es van afegir 2µL en cada reacció, i per a cada mostra, a diferència de l'amplificació d'*hec2*, on es van utilitzar 4µL. La diferència de volum es va compensar amb H<sub>2</sub>O.

### Condicions PCRs

Per a les amplificacions del gens *HECATE2* i *HECATE3* es van usar els programes de PCR continguts en les referències de la **taula 2**. En el cas d'*HECATE1* es va realitzar una optimització d'aquest mètode al laboratori.

Els programes de PCR finals es recullen a la **taula 4**.

**Taula 4. Programes de PCR utilitzats per a genotipar *HECATE***

<i>HEC1</i> (WT)	<i>HEC1</i> (mut)	<i>HEC2</i>	<i>HEC3</i>
94°C - 3min	94°C - 3min	95°C - 2min	94°C - 3min
<b>94°C - 20s</b>	Touchdown (60-65°C)	<b>95°C - 30s</b>	<b>94°C - 20s</b>
<b>56°C - 30s</b>   <b>35x</b>	<b>94°C - 20s</b>	<b>55°C - 30s</b>   <b>30x</b>	<b>55°C - 30s</b>   <b>45x</b>
<b>72°C - 1min</b>	<b>57°C - 30s</b>   <b>35x</b>	<b>72°C - 1min</b>	<b>72°C - 1min</b>
72°C - 5min	<b>72°C - 1min</b>	72°C - 1min	72°C - 5min
15°C - ∞	72°C - 5min	15°C - ∞	15°C - ∞
	15°C - ∞		

Es van usar els termocicladors 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) i SureCycler 880 (Agilent Technologies).

### Electroforesi en gel d'agarosa

La separació dels fragments d'ADN es va dur a terme mitjançant una electroforesi horitzontal, fent ús de gels d'agarosa a una concentració de l'1%, amb el tampó TBE 10X líquide concentrate (VWR, life science), que es va preparar a una concentració de l'1%. Als gels se'ls va incorporar 0,625mg/mL de bromur d'etidi, és a dir, aproximadament 1 gota per cada 50mL, per a poder visualitzar les bandes posteriorment a l'exposar-les a l'UV. Com a marcador de pes molecular es va usar Gene Ruler 1kb DNA Ladder, de Thermo Scientific, degut al tamany de banda esperada.

Les electroforesi es van realitzar en sistemes horitzontals "Sub-Cell GT" i "Mini-Sub Cell GT", connectats a una font d'alimentació "PowerPack™ Basic", tots ells de l'empresa BioRad (www.bio-rad.com).

Les bandes del gel es van visualitzar en un transil·luminador ENDURO™ GDS TOUCH (Labret).

### 3.2.2 INDEHISCENT

A diferència dels *HECATE*, en *INDEHISCENT* es va realitzar una única amplificació per mostra, és a dir, no va haver una amplificació específica per a l'al·lel WT i altra per al mutant, sinó que es va realitzar una en comú. A la **taula 5** s'adjunta la informació dels encebadors utilitzats en la PCR d'aquest gen.

**Taula 5. Informació encebadors utilitzats per a *INDEHISCENT***

	NOM COMERCIAL	SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA	T <sub>m</sub> (°C)
<b>IND</b>	GT140 - P	5' GCTAATGATCTTCTCACACAAGAAC 3'	53,9
	GtT140 - Q	5' ATCGCATCCATGTCTTCATCGTAC 3'	56,9

Els oligonucleòtids també van procedir de la casa comercial IDT (<https://eu.idtdna.com/pages/>).

Els components de la reacció de PCR són els mateixos que en *HECATE* (vore apartat 3.2.1).

#### Condicions PCR

El programa de PCR per a l'amplificació del gen *IND* va començar amb una incubació inicial de 94°C 10min, seguida de 40 cicles de 94°C 30s, T<sub>anellament</sub> de 55°C 45 i T<sub>extensió</sub> 72°C durant 1min, amb una incubació final de 72°C 5min.

Aquest programa va canviar respecte a allò que s'exposava a la referència d'*IND*, a la **taula 2**, canviant el número de cicles. Es van usar 40 cicles en compte de 30, després d'una optimització en el laboratori.

També es van usar els termocicladors 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) i SureCycler 880 (Agilent Technologies) per a dur a terme la reacció de PCR.

#### Digestió

Per a poder distingir l'al·lel mutant del WT en *nIND* en les diferents mostres es va dur a terme una digestió amb l'enzim AluI (Thermo Scientific).

Per a cada reacció es van introduir en un eppendorf 3µL d' H<sub>2</sub>O, 1µL de 10X Buffer Tango (amb BSA) (Thermo Scientific), 1µL de l'enzim AluI i 5µL de la mostra d'ADN. Després es van incubar en un termobloc a 37°C durant aproximadament 2 hores.

#### Electroforesi en gel d'agarosa

Per a la separació dels fragments d'ADN amplificats i digerits, es va dur a terme també una electroforesi en horitzontal, on es van emprar gels al 3% d'agarosa. Per a la seua creació, es va usar el tampó TBE 10X líquide concentrate (VWR, life science), que es va preparar a una concentració de l'1%. Als gels se'ls va incorporar també 0,625mg/mL de bromur d'etidi. Com a

marcador de pes molecular es va emprar Gene Ruler Low Range DNA Ladder, de Thermo Scientific, degut al tamany de banda esperada.

Es va usar tot el volum de la digestió (10µL) en l'electroforesi. Al igual que aquest procés en *HECATE*, també es van usar els sistemes horitzontals "Sub-Cell GT" i "Mini-Sub Cell GT", que estaven connectats a una font d'alimentació "PowerPack™ Basic", tots de BioRad (www.biorad.com), i el transil·luminador ENDURO™ GDS TOUCH (Labret) per tal d'observar les bandes del gel.

Abans de realitzar la digestió, es va córrer un gel, a l'1%, per comprovar l'efectivitat de la PCR, i observar els controls del procés, tant els positius com els negatius.

### 3.3 Anàlisi fenotípic de plantes mutants

Es va dur a terme l'estudi del perfil fenotípic de les plantes *hec1hec2hec3ind*, juntament amb les mostres control, per a poder fer una comparació entre elles i arribar a una conclusió. Per a això, es van arreplegar mostres d'inflorescències de plantes amb diferent genotipat respecte dels gens estudiats. D'aquesta forma, mitjançant una **lupa binocular Leica MZ16Z** connectada a un ordinador amb el software d'anàlisi d'imatge Leica Application Suite, es van fotografiar de diverses formes les estructures i les parts d'aquestes inflorescències.

Les mostres també es van muntar en un portaobjectes, amb una gota d'hidrat de cloral, perquè foren observades a un major augment en un **microscopi Nikon Eclipse E-600** acoblat a una càmera fotogràfica digital Nikon Digital-Sight (DS-Fil) i un ordinador amb el software d'anàlisi d'imatge AnalysSIS 3.0 (Soft Imaging System) i NIS-Elements F3.0.

D'altra banda, es va realitzar el tractament previ de les mostres a la seua visualització en el sistema de **Microscopia Electrònica de 'Barrido' (SEM)**. Es va fixar el material genètic amb FAE (50% d'etanol, 5% d'àcid acètic glacial i 3,7% de formaldehid), just després de la seua recol·lecció. Les mostres es van guardar a 4°C. Al dia següent, es va canviar el FAE per etanol al 70%, i en aquest punt el material es podia emmagatzemar indefinidament a 4°C fins al moment de la visualització al microscopi. Quan es va voler dur a terme l'anàlisi al SEM, les mostres es van incubar durant 30min en etanol al 80%, després al 90% també durant 30min, i finalment, 1h en etanol absolut. Aquest últim pas es va repetir fins a 3 vegades, sent l'última volta abans de sotmetre-les al punt crític.

El punt crític consisteix en la substitució d'etanol de la mostra a CO<sub>2</sub>, amb la seua posterior sublimació, que es va dur a terme en un aparell Polaron E300.

Posteriorment, les mostres es van muntar sobre un portaobjectes amb cinta adhesiva de carbono activat, orientades i disseccionades correctament. A continuació, aquestes van ser recobertes amb un ombrejat de partícules d'or-pal·ladi de 200nm, en atmosfera d'argó ionitzat en un Sputter Coater SCD005 (BALTEC).

També es van fotografiar les plantes senceres amb una **càmera digital Lumix**, i amb l'ajuda d'un trípod i una tela negra com a fons.

### 3.4 Construcció HEC3p:HEC3(CDS):GR mitjançant GoldenBraid

Actualment, la biologia sintètica té una gran influència en la biotecnologia vegetal, sobretot degut al descobriment de nous mètodes de clonació (Vazquez-Villar et al., 2017). Aquesta àrea requereix sistemes d'acoblament d'ADN eficients i versàtils que faciliten la construcció de noves rutes genètiques a partir de parts bàsiques de l'ADN d'una manera estandarditzada.

La tecnologia GoldenBraid (GB) va nàixer per a dur a terme aquesta funció. Es tracta d'un sistema d'acoblament estandarditzat basat en enzims de restricció tipus IIS, que permet el creixement indefinit de mòduls genètics reutilitzables fets de peces d'ADN estandarditzades. Està pensat especialment per a l'enginyeria multigènica (Sarrion-Perdigones et al., 2013).

Consta de 4 plasmidis de destí (pDGB) dissenyats perquè conjunts multipartits fets de parts d'ADN estàndards siguin incorporats i combinats de forma binària per a crear construccions cada volta més complexes.

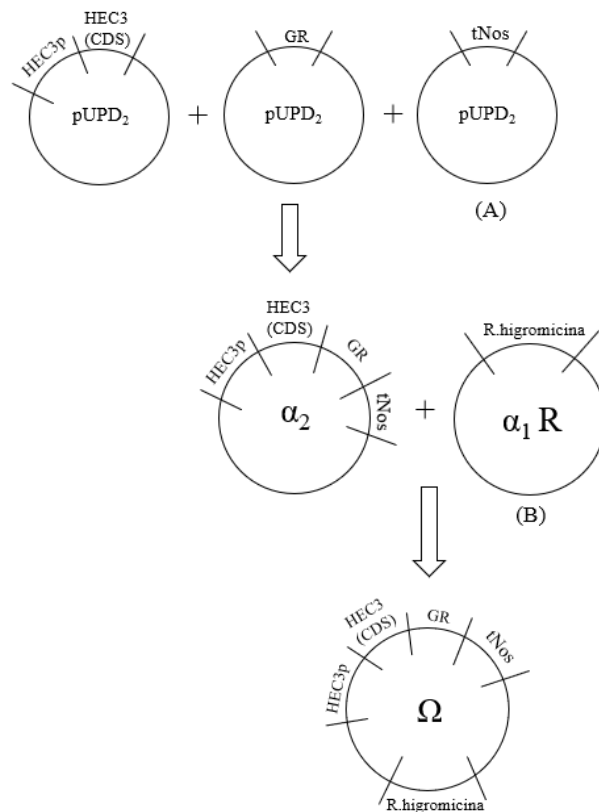
La simplicitat de la tecnologia facilita el seu ús per part dels usuaris, a la volta que redueix els elements usats i abrevia el procés d'automatització (Sarrion-Perdigones et al., 2011).

Al llarg dels anys aquesta tecnologia s'ha anat millorant, modificant i perfeccionant, i totes les noves incorporacions han anat donant lloc a diferents versions del GoldenBraid.

A mesura que es va investigant i es va avançant en la ciència, les diferents plataformes i tecnologies s'han d'anar adaptant per a poder anar de manera paral·lela als descobriments i que puguin suposar una ferramenta clau en el progrés científic.

En el present projecte s'ha utilitzat aquesta tecnologia amb la intenció de crear la construcció HEC3p:HEC3(CDS):GR (**figura 5**) com a via addicional i complementària a l'anàlisi fenotípic dels factors de transcripció HECATE1, HECATE2, HECATE3 i IND. Amb ella, en un futur, es generaran plantes transgèniques i s'observaran les conseqüències fenotípiques de la seua expressió.

Per a això s'ha de dur a terme un llarg procediment, que s'esquematitza a la **figura 5**.



**Figura 5. Representació esquemàtica del procediment a realitzar per a la clonació d'HEC3p:HEC3(CDS):GR, mitjançant GoldenBraid.** (A) Construcció depositada en [https://www.addgene.org/Diego\\_Orzaez](https://www.addgene.org/Diego_Orzaez) (referència GB0037). (B) Construcció depositada en [https://www.addgene.org/Diego\\_Orzaez](https://www.addgene.org/Diego_Orzaez) (referència GB0235). HEC3p: promotor d'*HECATE3*; HEC3(CDS): CDS d'*HECATE3*; pUPD<sub>2</sub>: plasmidi UPD<sub>2</sub>; α<sub>2</sub>: plasmidi tipus α<sub>2</sub>; α<sub>2</sub>R: plasmidi tipus α<sub>2</sub> revers; Ω: plasmidi tipus Ω; tNos: terminador del gen NOS d'*Agrobacterium tumefaciens*; R.higromicina: gen de resistència a higromicina.

En l'estructura final, HEC3p permetrà l'expressió de la CDS d'*HEC3*, el GR tindrà l'objectiu d'augmentar aquesta mateixa expressió, tNos serà un indicador de la presència de transgènic i el gen de resistència a higromicina (R.higromicina) s'usarà per al procés de selecció de plantes transgèniques.

Les construccions (A) i (B) no s'anaven a aconseguir en el treball experimental, sinó que s'anaven a obtenir del banc de plasmidis de Diego Orzáez ([https://www.addgene.org/Diego\\_Orzaez/](https://www.addgene.org/Diego_Orzaez/))

Els passos que s'han realitzat al laboratori per a la creació de la construcció es descriuen a continuació.

### 3.4.1 Domesticació al programa GoldenBraid

Abans de tot es va dissenyar l'experiment fent ús del programa GoldenBraid, i aquest va proporcionar les ferramentes i la informació necessàries per a dur-lo a terme de manera eficient.

En primer lloc, es van descarregar les seqüències de les tres parts de la construcció: el promotor d'*HECATE3*, la CDS d'*HECATE3* (sense codó d'STOP) i el GR.

Després, aquestes es van introduir en l'apartat 'Domestication' del programa GoldenBraid, que és el primer pas en l'estratègia d'acoblament. Es tracta d'una secció que té com a objectiu el disseny dels encebadors que amplificaran les parts corresponents a la construcció desitjada, eliminant els llocs de restricció interns per als enzims usats en el GB. També implica l'addició de 4 nucleòtids en els extrems dels encebadors, amb l'objectiu que puguin ser flanquejants.

Amb aquesta premissa, es va obtenir la naturalesa dels encebadors que amplificarien les parts de la construcció. Les característiques dels mateixos i el procediment es detallen a continuació.

### 3.4.2 Amplificació d'HEC3p:HEC3(CDS)

Es va obtenir el promotor d'*HECATE3* (HEC3p) junt a la CDS d'*HEC3*, en dos parts diferents, mitjançant la PCR, i a partir d'una mostra WT. Els encebadors oPBF 191 i oPBF 192 van amplificar una primera part del promotor, i el oPBF 193 i el oPBF 195 ho van fer per al que restava d'ell i per a HEC3(CDS). Així, aquests dos fragments conformaven la primera part de la construcció desitjada. A la **taula 6** s'adjunta la informació dels encebadors d'aquesta etapa.

**Taula 6. Informació encebadors utilitzats per a l'amplificació d'HEC3p:HEC3(CDS)**

ENCEBADORS	SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA	T <sub>m</sub> (°C)
oPBF 191	5' GCGCCGTCTCGCTCGGGAGATTTATTTTACTAATTACAGACAAAATTTAC 3'	64,9
oPBF 192	5' GCGCCGTCTCGTGATCTCTTACAGCGACTTCT 3'	66,5
oPBF 193	5' GCGCCGTCTCGATCAGACTCTGAGGAAATGAG 3'	65,3
oPBF 195	5' GCGCCGTCTCGCTCACATTGATTAATTCTCCTACTCTCTTC 3'	66,4

Per a cada un dels amplificats es van fer 3 rèpliques, amb l'objectiu d'aconseguir una concentració lo suficientment alta com per a augmentar les probabilitats d'èxit a la clonació posterior.

En la reacció de PCR van discrepar lleugerament. En el cas de la 1<sup>a</sup> part del promotor va ser la següent: 9,4µL d'H<sub>2</sub>O, 4µL de 5X Phussion GC Buffer (Thermo Scientific), 1,6µL de dNTPs (2,5mM) (PROMEGA), 1µL de cada encebador (10mM) (PROMEGA) i 1µL de Taq Phussion® High-Fidelity (New England Biolabs). Per a la resta del promotor i la CDS d'*HECATE3* va ser aquesta: 29,5µL d'H<sub>2</sub>O, 10µL de 5X Phussion HF Buffer (Thermo Scientific), 1µL de dNTPs (10mM) (PROMEGA), 1µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM) (PROMEGA), 2,5 µL de cada encebador (10mM) (PROMEGA) i 0,5µL de Taq Phussion® High-Fidelity (New England Biolabs). La diferència més significativa entre les amplificacions va ser el volum final de reacció.

Es va usar el següent programa de PCR: incubació inicial de 98°C durant 5min, seguit de 40 cicles de 98°C 30s, T<sub>anellament</sub> de 68°C 30s i T<sub>extensió</sub> de 72°C amb variació de temps depenent de l'amplificat (per a la 1<sup>a</sup> part d'HEC3p, 1min, i per a la 2<sup>a</sup> i HEC3, 2min), amb una incubació final de 72°C 10min.

Per a la visualització dels fragments es va dur a terme una electroforesi horitzontal, en gel a l'1% d'agarosa. Els components i materials per dur-ho a terme van ser els mateixos que s'especifiquen als apartats d'electroforesi anteriors.



A aquest procés es va utilitzar tot el volum de la PCR i, per tal d'aconseguir l'amplificat, es va tallar la banda corresponent al mateix. Per a la seua purificació es va seguir el protocol del kit mi-Gel extraction, de metabion ([www.metabion.com](http://www.metabion.com)).

### 3.4.3 Amplificació del GR

Per a l'amplificació del promotor del gen del glucocorticoides es va fer ús dels encebadors oPBF 196 i oPBF 197.

En la reacció de PCR es va incloure el següent: 29,5µL d'H<sub>2</sub>O, 10µL de 5X Phussion HF Buffer (Thermo Scientific), 1µL de dNTPs (10mM) (PROMEGA), 1µL de MgCl<sub>2</sub> (PROMEGA), 2,5 µL de cada encebador (10mM) (PROMEGA) i 0,5µL de Taq Phussion® High-Fidelity (New England Biolabs).

El programa del termociclador va ser: 98°C durant 5min com a incubació inicial, seguida de 40 cicles de 98°C 30s, T<sub>anellament</sub> de 68°C 30s i T<sub>extensió</sub> de 72°C 2min, amb una incubació final de 72°C 10min.

Per a la separació dels fragments amplificats es va realitzar una electroforesi horitzontal en gel (a l'1%) d'agarosa. Els components i materials per dur-ho a terme van ser els mateixos que s'especificuen als apartats d'electroforesi anteriors.

Es va usar tot el volum de la PCR en l'electroforesi i, després, es va tallar la banda que corresponia al tamany de la GR a partir del gel. Per tal d'aconseguir l'amplificació pura, es va usar el protocol del kit Zymoclean Gel DNA Recovery, de ZYMO RESEARCH ([www.zymoresearch.com](http://www.zymoresearch.com)).

### 3.4.4 Clonatge i transformació en *Escherichia coli*

Amb les amplificacions de cada una de les parts que formaran la construcció anomenada anteriorment, es va dur a terme la seua clonació en el plasmidi UPD<sub>2</sub>. HEC3p:HEC3(CDS), d'una banda, i el GR, per altra, es van clonar, transformar i testar de manera independent entre ells.

En la reacció de lligació en pUPD<sub>2</sub> es va usar el següent: 40ng de l'amplificat, 75ng del plasmidi, 5-10u de l'enzim BsBmI (Thermo Scientific), 3u de T4 DNA ligase (PROMEGA), 1µL de BSA (al 0,1%), 1µL del buffer 10X T4 DNA ligase, i el que restava fins a arribar a 10µL es va suplir amb H<sub>2</sub>O per al cas de la GR, i per a HEC3p:HEC3(CDS) es va augmentar en 1µL el plasmidi i cada un dels inserts.

El programa de PCR usat va ser aquest: incubació inicial de 37°C durant 20min, seguit de 25 cicles per a GR i de 30 per a HEC3p:HEC3(CDS) de 37°C 3min i 16°C 4min, i després, 10min a 50°C i 10min a 80°C.

En el cas d'HEC3p:HEC3(CDS), es va dialitzar la reacció de lligació. El volum es va depositar sobre una membrana que es trobava sobre un bany d'aigua, a una placa Petri. Transcorreguts 10 minuts, es va recuperar. Amb aquest procés s'intentava reduir al màxim la presència de sals.

A continuació, es va transformar en *Escherichia coli*. Per a això, es va incorporar 1µL de la clonació en el cas de GR i 10 µL en el d'HEC3p:HEC3(CDS) en cèl·lules competents d'aquesta

cepa bacteriana, i es va electroporar a, aproximadament, 1700V. Després, el resultat es va incubar en 1,5mL d'LB\* a 37°C durant 1h, en agitació mínima (300rpm).

\*Preparació d'1L de medi LB: 1L d' H<sub>2</sub>O, 10g de triptona (Condalab), 5g d'extracte de rent (CONDA) i 10g de NaCl (PanReac AppliChem). Per al medi en sòlid, es van incorporar 15g d'agar (Condalab) a la mescla.

Transcorregut eixe temps, 50µL de l'eppendorf van ser depositats i repartits homogèniament, mitjançant anses de sembra de plàstic, sobre unes plaques que contenien una relació 1000:1:1 d'LB sòlid:cloranfenicol(25mg/mL):Xgal. Aquestes van ser incubades durant aproximadament 1 dia a 37°C. El plasmidi usat contenia un gen de resistència a l'antibiòtic cloramfenicol, per això aquest va ser usat com a medi de selecció. De la mateixa manera, també posseïa el gen de la β-galactosidasa (*lacZ*), i va actuar com a medi també de selecció. La proteïna β-galactosidasa, codificada pel *lacZ*, hidrolitza el X-gal i forma, després d'una oxidació, un compost blau.

### **Pre-cultius**

A partir d'eixes plaques, es van picar diverses colònies blanques (són les que suposadament havien incorporat el plasmidi amb un fragment entre el gen *lacZ*, provocant el seu 'knock-out') i cada una d'elles va ser incorporada a un falcon, que contenia 4mL de medi, en una relació 1000:1 d'LB líquid:cloranfenicol, i que estaven correctament rotulats per tal d'evitar confusions. En el cas d'HEC3p:HEC3(CDS) es van incubar durant 5-6h a 37°C en agitació, mentre que per a GR la incubació es va estendre fins les 24h.

### **3.4.5 Recuperació del plasmidi (mini-prep)**

Per tal d'extraure el plasmidi de cada un dels cultius bacterians (mini-prep) es va seguir el protocol del kit nzyminiprep, de l'empresa nzytech ([www.nzytech.com](http://www.nzytech.com)). Cal destacar que es van usar 30µL del tampó d'elució per a cada mostra, amb l'objectiu d'obtindre una major concentració.

### **3.4.6 Testat de la construcció creada**

Per a comprovar la naturalesa del plasmidi clonat i transformat es van dur a terme diferents digestions, amb enzims distints. La pàgina web GoldenBraid va proporcionar els enzims que s'havien d'usar per a la verificació, així com també els resultats esperats.

Els enzims i els seus respectius tampons eren de la casa comercial Thermo Scientific.

Per a HEC3p:HEC3(CDS) es va fer ús dels enzims EcoRI, HindIII, Eco123 i BsaI.

En el cas de la GR, es van usar els enzims XhoI i BsaI.

L'enzim EcoRI tenia un tampó propi, mentre que per a HindIII, XhoI i Eco123 es va usar el R, i per a BsaI el G.

No obstant això, el volum i la composició de la digestió va ser la mateixa per a les diferents parts de la construcció, i és la següent: 5µL d'H<sub>2</sub>O, 1µL de l'enzim, 1µL del tampó i 3µL de la mini-prep corresponent.

Per a la visualització de les bandes es va realitzar una electroforesis horitzontal, en gel a l'1% d'agarosa. Els components i materials per dur-ho a terme van ser els mateixos que s'especificuen als apartats d'electroforesi anteriors.

## **Seqüenciació**

Per tal d'esbrinar amb més exactitud la naturalesa nucleotídica del fragment que s'havia incorporat al pUPD<sub>2</sub> en l'intent de clonació d'HEC3p:HEC3(CDS), el plasmidi es va seqüenciar amb els oligonucleòtids pUPD<sub>2</sub>Rw i el pUPD<sub>2</sub>Fwd (Thermo Scientific).

El resultat va ser proporcionat pel servei de seqüenciació de què disposava l'IBMCP.

Amb açò, es va dur a terme l'alineament de la seqüència obtinguda i es va conèixer allò que s'havia incorporat al plasmidi.

## **3.5 Treball i condicions d'hivernacle**

Les llavors d'*Arabidopsis thaliana* que es requerien van ser sembrades en alvèols de plàstic de 6,5x6,5x6,5cm amb una mescla de turba:perleta:vermiculita, amb una proporció de 2:1:1. Aquesta mescla havia sigut esterilitzada prèviament a 80°C durant 20 minuts i humitejada amb aigua.

Després, els alvèols van ser depositats en safates, cobertes amb film de plàstic i guardats en vernalització, durant un període de 3 dies a 4°C, i en condicions de foscor.

Posteriorment, es van traslladar a una càmera de cultiu, on van ser emmagatzemats en un fotoperíode de 16 hores de llum i 8 de foscor, amb una temperatura que oscil·lava entre els 21 i 22°C.

Amb la germinació de les llavors i l'aparició de les primeres fulles es va foradar el film, i al cap de 3-4 dies, es va retirar completament el plàstic. Periòdicament, les plantes eren regades per immersió amb una solució Hoagland n°1, suplementada amb oligoelements.

Amb tot, una volta van completar el seu cicle, es van recobrir amb una bossa individualment i es van mantindre a l'hivernacle fins que es van assecar per complet. Les llavors es van recol·lectar amb l'ajuda d'un colador.

## **Tutorat de les plantes**

Una de les tasques que també es va dur a terme a l'hivernacle va ser el tutorat de les plantes que s'havien sembrat. D'aquesta forma, amb una canya per planta, es va proporcionar un suport a la mateixa perquè estiguera dreçada i hi haguera un major rendiment per unitat de superfície. A més a més, també va facilitar la llavor de recollida de mostres de manera individual.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1 Genotipat d'*HECATE* i *INDEHISCENT* en les línies vegetals

Un dels objectius d'aquest projecte era saber si els gens *HECATE* i *INDEHISCENT*, de manera conjunta, participaven en la dehiscència de les antereres d'*Arabidopsis thaliana*. És per això que era necessària una planta que estiguera mutada, homocigòticament, en els 4 gens, per tal d'estudiar-la i analitzar les seues conseqüències fenotípiques en l'antera.

Es van genotipar totes i cada una de les plantes de les dos línies que s'han exposat a l'apartat 3, que en total eren 76 (44 per a la línia 1 i 32 per a la 2). La línia 1 es va usar per a la búsqueda del quàdruple mutant, mentre que de la 2 només es podia aconseguir un triple *hec1hec3ind*, degut a les característiques del seu encreuament (apartat 3). Aquesta última tenia l'objectiu de tindre línies fèrtils, per a poder ser utilitzades en treballs posteriors.

Els tamanys esperats de l'amplificació per a cada gen van ser extrets de les referències de la **taula 2**.

Es va genotipar primerament per a *HEC3* i *HEC1*, i les mostres que van resultar ser *hec1hec3* van ser seleccionades per a continuar amb el genotipat. La resta van ser descartades per no ser d'interès.

Les mostres *hec1* van mostrar una banda de 750pb en l'amplificació mut, i cap en la WT. Al mateix temps, aquelles *hec3* tenien banda de 550pb en l'amplificació mut i cap en la WT.

Les mostres *hec1hec3* s'enumeren a continuació.

- **Línia 1:** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 22, 25, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44
- **Línia 2:** 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31

El genotipat va continuar amb el gen *INDEHISCENT*, en les mostres seleccionades anteriorment. En aquest cas, aquelles *ind* van mostrar una única banda a l'electroforesi, de 130pb. Van ser descartades totes les mostres de la línia 2 per a genotipar-les per a *HEC2*, ja que no eren mutants per a aquest gen.

El resultat va ser majoritàriament de caràcter heterocigot. Les mostres *hec1hec3ind +/-* van ser:

- **Línia 1:** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 15, 16, 17, 19, 25, 35, 38
- **Línia 2:** 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31

No obstant això, va haver una mostra que va resultar ser *hec1hec3ind*. La **mostra 42** de la línia 1 va ser la única mutant per als 3 gens, i es va convertir en la màxima candidata per a l'anàlisi fenotípic, a l'espera del genotipat per a *HEC2*.

Finalment, es va dur a terme l'amplificació d'*HEC2*, per als dos possibles al·lells, i per a les mostres anteriors, de solament la línia 1. En l'amplificació de l'al·lel mutant s'esperava una banda d'aproximadament 600pb, mentre que en la del WT era de 800pb.

Amb tot, va haver disparitat de resultats finals entre les mostres, i s'esquematitza lleugerament a continuació.

- *hec1hec3hec2 +/-ind +/-* : en la pròxima generació de les mostres amb aquest genotip s'esperava un quàdruple mutant en una proporció 1:15.
- *hec1hec3hec2ind +/-*: les mostres resultants d'aquest genotip eren estèrils i, per tant, a partir d'elles no es podia crear una nova generació per a trobar el quàdruple mutant.
- *hec1hec3hec2 +/-ind*: 1 de cada 4 en la prèxima generació, per a cada mostra amb aquest genotip, seria quàdruple mutant.

No es va aconseguir cap mostra *hec1hec2hec3ind* en aquest primer genotipat. No obstant això, per tal d'obtindre-la s'havia de produir una nova segregació de les mostres de què es disposava.

Així, per a augmentar la probabilitat d'èxit, es van triar aquelles mostres que estaven en heterocigosi per a *IND*, i que eren mutants per a la resta. Només una tenia aquestes característiques genètiques, i va ser la elegida per a continuar en la investigació. Aquesta va ser la **mostra 42**, de la línia 1.

#### 4.1.1 Regenotipat de la nova generació de la mostra 42

Es van sembrar al voltant d'unes 70 llavors de la mostra 42, però en una primera tanda se'n van genotipar un poc menys de la mitat d'aquestes.

El primer gen que es va estudiar va ser *HEC2*, ja que era el que es trobava en heterocigosi en la generació anterior. Els altres gens s'esperava que foren mutants per a les noves plantes, ja que procedien d'una mostra homocigota mutant.

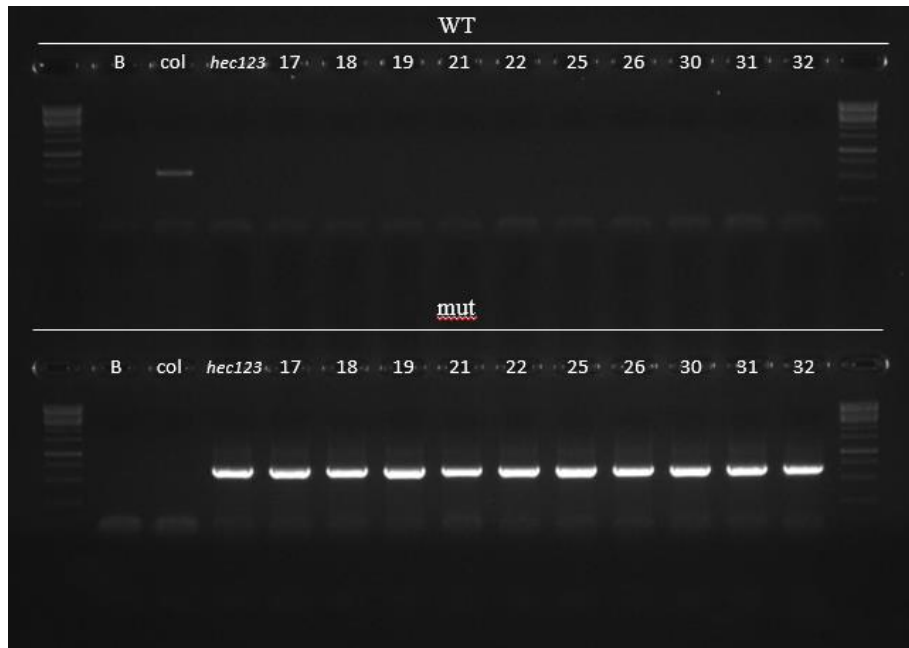
Així, 10 mostres van resultar ser *hec2*, que són les següents:

- 17, 18, 19, 21, 22, 25, 26, 30, 31, 32

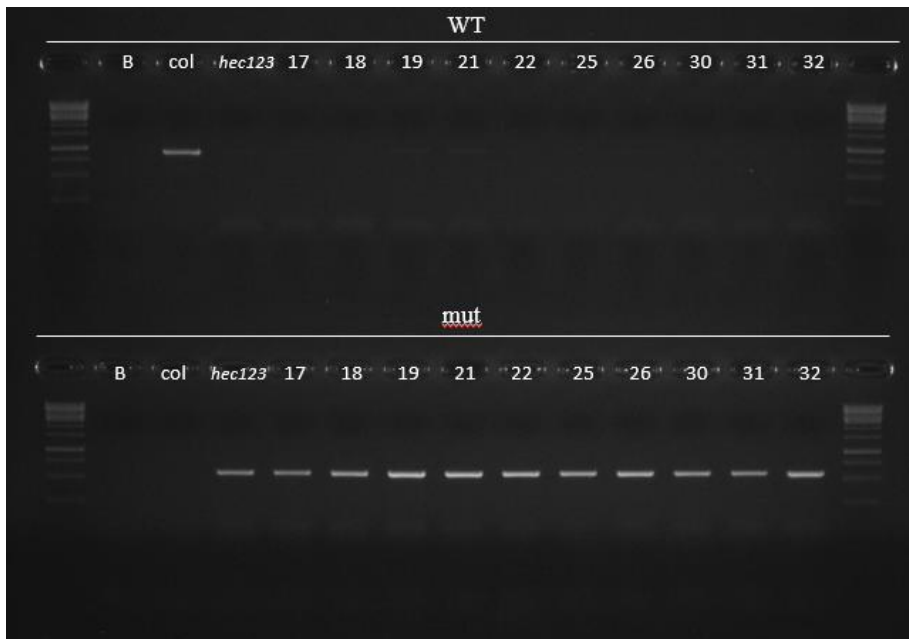
Aquestes plantes van ser regenotipades per a la resta de gens, així com també per a *HEC2*, per tal d'assegurar-se que eren *hec1hec2hec3ind*, que és el que es buscava.

El genotipat d'aquestes mostres per a cada gen s'il·lustra a continuació, en les **figures 6, 7, 8, 9 i 10**. A aquest genotipat es troben també mostres control, com són la variant Columbia-0\*, *hec1hec2hec3* i *ind*.

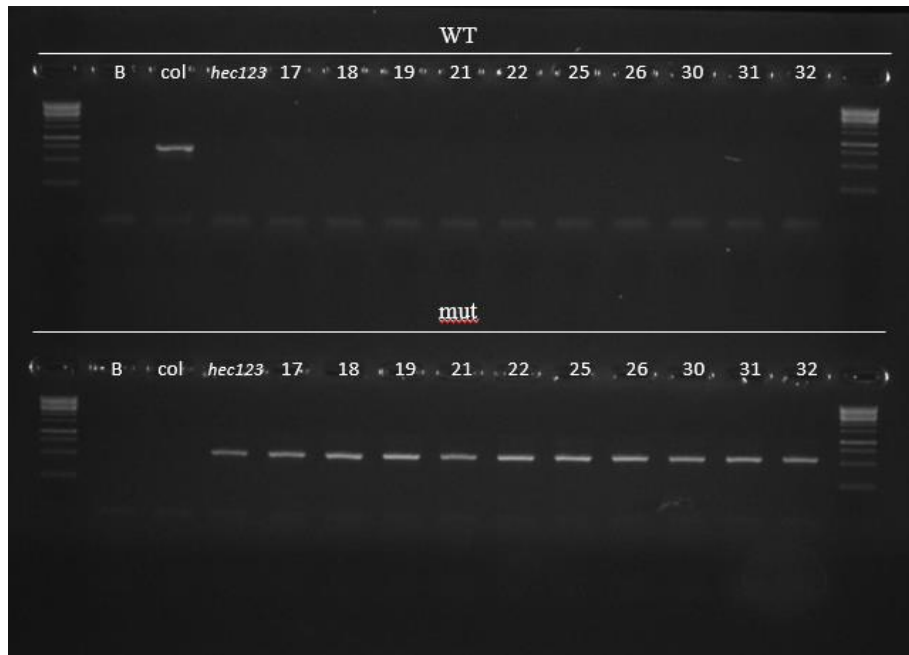
\*mostra silvestre



**Figura 6. Genotipat d'HECATE1.** Electroforesi que mostra el resultat del genotipat d'HECATE1. WT: amplificació per a l'al·lel WT; mut: amplificació per a l'al·lel mutant; B: control per contaminació; col: Columbia-0; *hec123*: *hec1hec2hec3*. Cada número representa una planta



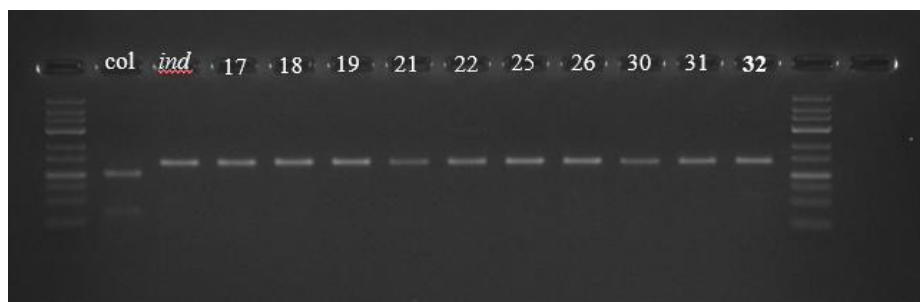
**Figura 7. Genotipat d'HECATE2.** Electroforesi que mostra el resultat del genotipat d'HECATE2. WT: amplificació per a l'al·lel WT; mut: amplificació per a l'al·lel mutant; B: control per contaminació; col: Columbia-0; *hec123*: *hec1hec2hec3*. Cada número representa una planta



**Figura 8. Genotipat d'HECATE3.** Electroforesi que mostra el resultat del genotipat d'HECATE3. WT: amplificació per a l'al·lel WT; mut: amplificació per a l'al·lel mutant; B: control per contaminació; col: Columbia-0; *hec123*: *hec1hec2hec3*. Cada número representa una planta



**Figura 9. Amplificació d'INDEHISCENT.** Electroforesi de l'amplificació del gen INDEHISCENT. B: control per contaminació; col: Columbia-0; ind: indehiscent. Cada número representa una planta.



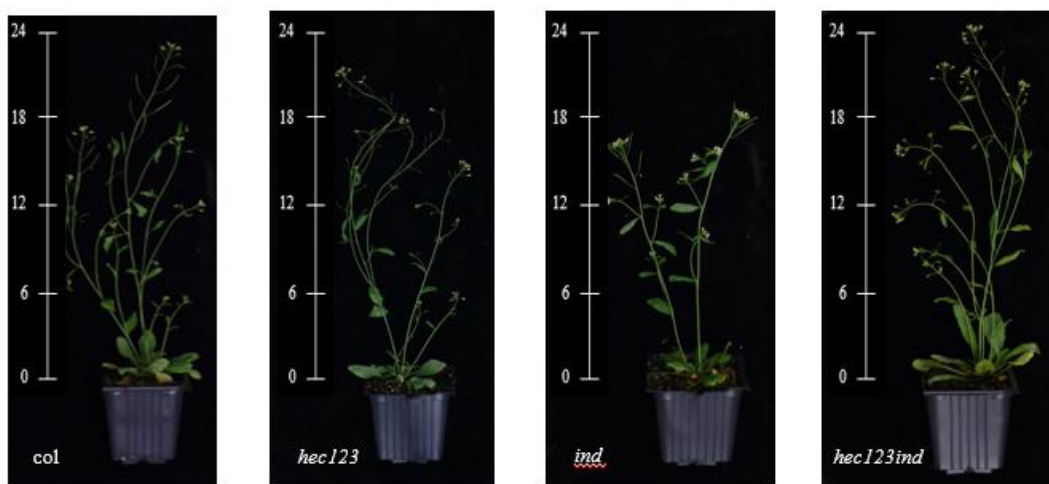
**Figura 10. Genotipat d'INDEHISCENT.** Electroforesi que mostra el resultat del genotipat del gen INDEHISCENT. B: control per contaminació; col: Columbia-0; ind: indehiscent. Cada número representa una planta.

Com s'observa, finalment es van aconseguir 10 mostres *hec1hec2hec3ind*, i a partir d'elles es va estudiar el seu fenotip per tal d'aclarir la redundància funcional d'aquests gens en la dehiscència de les anteres en *Arabidopsis thaliana*.

## 4.2 Caracterització fenotípica d'*hec1hec2hec3ind*

L'observació microscòpica comparada de les anteres en *Arabidopsis thaliana* era essencial en aquest treball. Per a això, es van obtenir imatges de diferents formes de la flor de les plantes, per tal de tindre un estudi exhaustiu i detallat. A més a més, com en qualsevol projecte, s'han d'equiparar els resultats amb controls. En aquest cas, per a açò últim, es van usar mostres *ind*, *hec1hec2hec3* i Columbia-0 (*col*).

Primerament es van fotografiar les plantes senceres, és a dir, tota la mostra vegetal que eixia de l'alvèol. Amb açò s'aconseguia una primera visió fenotípica i permetia una comparació ràpida i generalitzada. La **figura 11** il·lustra el resultat.



**Figura 11.** Fotografies de tota l'estructura vegetal d'*Arabidopsis thaliana*. *col*: Columbia-0; *hec123*: *hec1hec2hec3*; *ind*: *indehiscent*; *hec123ind*; *hec1hec2hec3ind*. Escala en centímetres.

Cal destacar que les plantes *ind* van resultar ser d'un menor tamany que la resta, ja que aquesta pertany a la variant Ler. La diferència entre les altres va ser no significativa respecte d'aquesta variable.

Després, a la lupa LEICA, es va reduir el camp de visió de les mostres vegetals i es van fotografiar les inflorescències (**figura 12**) i les flors, on es va poder observar el gineceu i les anteres. A més a més, d'aquestes últimes es van estudiar en diferents etapes de la floració: pre-antesi, antesi i post-antesi (**figura 13, 14 i 15**, respectivament).





**Figura 12. Fotografies d'inflorescències d'*Arabidopsis thaliana*.** col: Columbia-0; *hec123*: *hec1hec2hec3*; *ind*: *indehiscent*; *hec123ind*; *hec1hec2hec3ind*. Escala en mil·límetres.

Aquestes imatges mostren la no desigualtat morfològica destacada en les inflorescències de les diferents plantes.



**Figura 13. Fotografies florals d'*Arabidopsis thaliana* en l'etapa de pre-antesi.** col: Columbia-0; *hec123*: *hec1hec2hec3*; *ind*: *indehiscent*; *hec123ind*; *hec1hec2hec3ind*. Escala en mil·límetres.

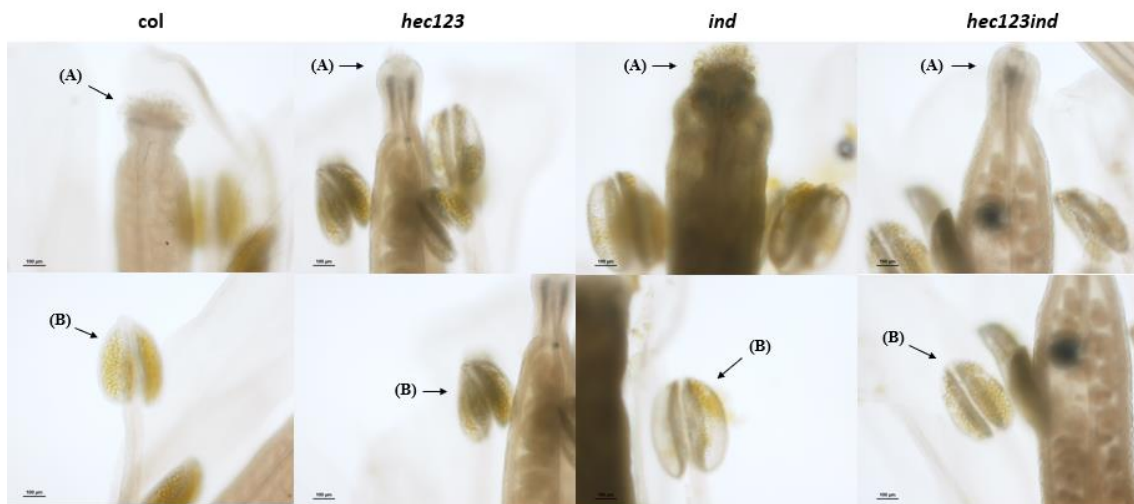


**Figura 14. Fotografies florals d'*Arabidopsis thaliana* en l'etapa d'antesi.** col: Columbia-0; *hec123*: *hec1hec2hec3*; *ind*: *indehiscent*; *hec123ind*; *hec1hec2hec3ind*. Escala en mil·límetres.



**Figura 15.** Fotografies florals d'*Arabidopsis thaliana* en l'etapa de post-antesi. col: Columbia-0; *hec123*: *hec1hec2hec3*; *ind*: *indehiscent*; *hec123ind*: *hec1hec2hec3ind*. Escala en mil·límetres.

També es va apropar a la zona d'interés (zona apical), per tal d'obtenir una imatge més aclaridora i visual (figura 16). Aquestes es van aconseguir gràcies al microscopi Nikon



**Figura 16.** Fotografies de la zona apical d'*Arabidopsis thaliana*. (A) Estigma. (B) Antera. col: Columbia-0; *hec123*: *hec1hec2hec3*; *ind*: *indehiscent*; *hec123ind*: *hec1hec2hec3ind*. Escala en mil·límetres.

Les fotografies del SEM no s'han pogut adjuntar pel fet que la llista de reserva del servei d'aquest microscopi a la UPV era molt extensa, i no es va poder fer ús d'ell abans de l'entrega del present document. Amb tot, s'espera poder mostrar aquestes fotografies a la defensa d'aquest treball.

No obstant això, de les últimes fotografies adjuntades es poden extraure conclusions. D'una banda, les mostres *hec123* i *hec123ind* van resultar ser estèrils degut a la mutació en els 3 gens *HECATE*, informació que ja s'havia mencionat a la introducció. És per això que en les flors de les plantes amb eixe genotip es mostren defectes en l'estigma. Aquesta imperfecció s'observa millor a la figura 16.

D'altra banda, si es pren atenció a les antereres de les flors que s'han il·lustrat, s'observa que s'ha produït la dispersió del pol·len que contenen al seu interior, és a dir, s'ha originat la dehiscència de les mateixes (figura 16).

Per tant, ni la mutació en els 3 gens *HECATE*, ni en el *INDEHISCENT* (ja era coneguda aquesta informació), ni en els 4 simultàniament, ha sigut suficient per a provocar la indehiscència d'aquesta part de l'òrgan reproductor femení.

Tal com ja s'ha mencionat a la introducció, en les espècies *Nicotiana benthamiana* i en altra espècie, la mutació en el gen ortòleg (*NibeHEC3*) d'un únic gen *HECATE*, l'*HEC3*, i en el *RIAI* (un gen bHLH relacionat), respectivament, va provocar la no obertura de les antereres (Ortiz-Ramírez et al., 2018). No obstant això, en l'espècie que s'estudia en el present projecte, *Arabidopsis thaliana*, no solament la mutació en *HEC3* no ha provocat eixe efecte, sinó que tampoc ho ha fet conjuntament amb *hec1* i *hec2*, ni amb aquests i *ind*.

Tota aquesta informació deixa l'estudi de la regulació de la dehiscència de les antereres en *Arabidopsis* encara obert, i és necessària una investigació més exhaustiva per a poder resoldre la incògnita.

Amb tot, l'anàlisi futur s'hauria d'enfocar en incloure a aquesta investigació més proteïnes que pogueren estar relacionades amb eixa funcionalitat. Entre ells poden estar SPATULA, que interactua amb les *HECATE* i *INDEHISCENT* (Gremsky et al., 2007; Girin et al., 2011), NGATHA, que està relacionat funcionalment amb *HECATE* (Gaillochet et al., 2017), ETTIN, que coopera amb *IND* (Kuhn et al., 2019), o ALCATRAZ, que participa en la zona de dehiscència del fruit, i per tant, té una funcionalitat molt estreta amb *IND*.

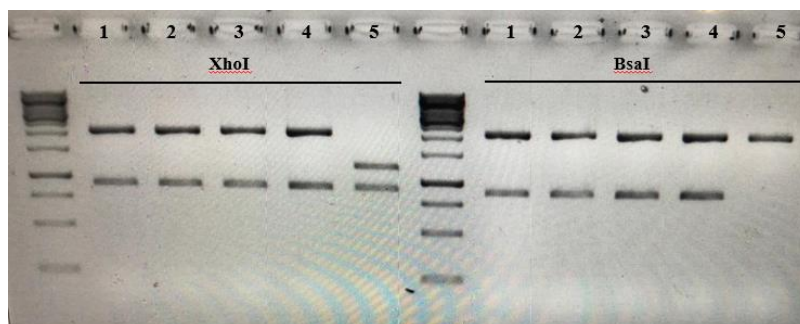
### 4.3 Construcció HEC3p:HEC3(CDS):GR

Un dels altres objectius del present treball era la creació de la construcció HEC3p:HEC3(CDS):GR, mitjançant la tecnologia GoldenBraid, per tal de ser usada en un futur per a l'observació fenotípica de la seua expressió en plantes d'*Arabidopsis thaliana*.

Es va seguir tot el procés descrit a l'apartat 3.4 de manera minuciosa i no va ser fins l'etapa final de les digestions (testat) que es va comprovar si HEC3p:HEC3(CDS) d'una banda, i el GR ,per altra, havien estat clonats amb èxit al plasmidi UPD<sub>2</sub>, de manera independent.

El programa GoldenBraid va proporcionar els tamanyos esperats en l'electroforesi després de la digestió de les mini-prep amb els enzims mencionats a l'apartat 3.4.6.

El plasmidi clonat suposadament amb el GR es va digerir amb XhoI i BsaI, independentment, i les bandes esperades eren de 900pb i 2100pb, aproximadament. Per als dos enzims s'esperava pràcticament el mateix patró en l'electroforesi. A la **figura 17** es mostra aquesta última.



**Figura 17.** Electroforesi del testat de la clonació del GR al plasmidi UPD<sub>2</sub> amb els enzims XhoI i BsaI. Cada número correspon a una colònia diferent.

Com s'observa, el patró de digestió del plasmidi de les 4 primeres colònies, per als dos enzims, coincideix amb allò esperat per a una clonació exitosa. Per tant, en aquest punt es tenien **4 mostres amb el GR clonat en el plasmidi UPD<sub>2</sub>**.

Aquest resultat es va obtenir en un primer intent del procediment, però no es va tindre la mateixa sort per a la resta de la construcció.

Per a HEC3p:HEC3(CDS), que s'anaven a clonar conjuntament i a la vegada en pUPD<sub>2</sub>, el procés es va repetir moltes vegades, ja que el patró de bandes en l'electroforesi quan es testava no representava la inserció d'aquest fragment en el plasmidi. Durant els intents, es va anar perfeccionant el procés, però sense èxit. Les característiques últimes del mateix, i que es van considerar més apropiades per al procediment, són les que estan explicades en aquest document.

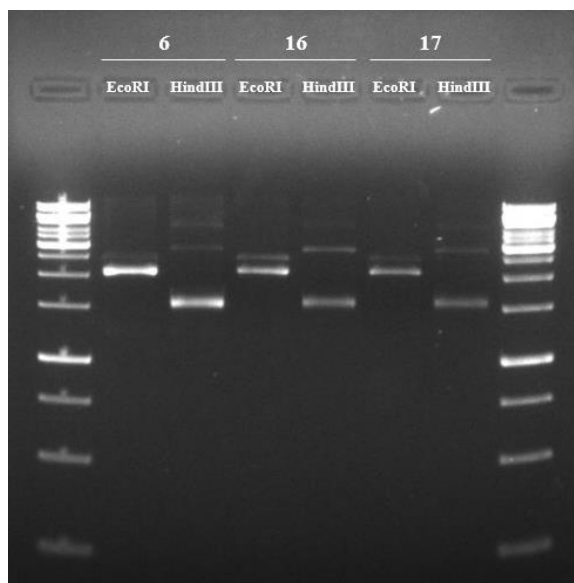
El patró de les digestions de tots els intents de clonació d'HEC3p:HEC3(CDS) eres molt similars i cap esperat. Es va a il·lustrar l'última repetició de la clonació, com a representació de la resta. A la **figura 18** s'adjunta la penúltima electroforesi del testat d'aquesta part de la construcció.



**Figura 18.** Electroforesi del testat de la clonació d'HEC3p:HEC3(CDS) al plasmidi UPD<sub>2</sub> amb els enzims BsaI i Eco321. Cada número correspon a una colònia diferent.

Per a una clonació correcta, s'esperava una banda de 2105pb i una de 4417pb per a la digestió amb BsaI i una banda de 2055pb i una de 4467pb per a la digestió amb Eco321. Si ens fixem en els resultats de la colònia 6, 16 i 17 per a l'enzim Eco321 s'observa que el patró de digestió de les mateixes és lleugerament l'esperat, però no es va poder determinar un resultat definitiu ja que les bandes no van ser molt nítides.

Per tal de confirmar la naturalesa del plasmidi d'aquestes colònies es van testar amb altres dos enzims, EcoRI i HindIII. El GB va proporcionar el patró desitjat: banda de 380pb, de 2300pb i 3800pb, aproximadament, per a la digestió amb EcoRI, i banda de 2600pb i 3900pb, aproximadament, per a la digestió amb HindIII. El resultat es mostra a la **figura 19**.



**Figura 19.** Electroforesi del testat de la clonació d'HEC3p:HEC3(CDS) al plasmidi UPD<sub>2</sub> amb els enzims EcoRI i HindIII per a les colònies 6, 16 i 17.

Així, es va comprovar que cap de les colònies contenia HEC3p:HEC3(CDS) al plasmidi, ja que el patró de digestió no era correcte, i per tant, en el present projecte **no es va poder aconseguir clonar aquesta part de la construcció en el pUPD<sub>2</sub>**. Açò es va corroborar amb la seqüenciació del plasmidi. El resultat va mostrar que aquest estava buit, que no havia incorporat cap fragment.

En la majoria de les digestions amb BsaI i Eco321, la electroforesi va mostrar una única banda, d'un tamany d'aproximadament 2200pb, com es mostra a la majoria de les colònies de la **figura 18**. Amb aquesta premissa es va concloure que eixes colònies havien incorporat el plasmidi, però buit, sense clonar, ja que el tamany del pUPD<sub>2</sub> és d'aproximadament 2200pb.

Els altres patrons de bandes observats durant els intents de clonació corresponien a insercions en el plasmidi diferents a HEC3p:HEC3(CDS) i, per tant, no eren útils per al projecte, i es van descartar.

Quins aspectes es van anar perfeccionant durant els intents?

- Volúmens de reactius en la reacció de lligació. En un primer moment, s'afegia H<sub>2</sub>O per a completar el volum final de la reacció a 10µL. Al final, es va optar per suplir aquest reactiu per l'augment de volum dels fragments a insertar i el plasmidi.
- Temps d'incubació dels pre-cultius. Al començament, aquest era de 24h, igual que per a la GR, però després de diversos intents erronis es va reduir a 6h, ja que potser la llarga incubació inicial conduïa a la metilació del plasmidi, i no permetia la digestió posterior, adulterant així els resultats.

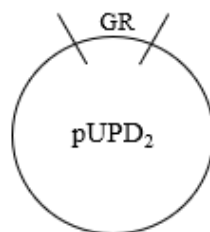
Per què la clonació d'aquesta part no va resultar exitosa?

Poden ser diverses les raons, sent una d'elles la falta de temps per a tornar-ho a intentar i perfeccionar el procés. Degut a la pandèmia, la major part dels estudiants vam incorporar-se tard als centres d'investigació per tal de realitzar el treball, un condicionant important per a la resolució completa del projecte.

A més a més, en aquest procediment s'havien de clonar simultàniament dos fragments, factor que reduïa la probabilitat d'èxit, ja que és un mètode que requereix de complementaritat i precisió, i quant més són els elements participants del procés, més és la dificultat perquè tot encaixe a la perfecció.

En aquesta variant també entraria l'aspecte de les proporcions. Podria estar la possibilitat que la relació estequiomètrica entre els reactius de l'etapa de la lligació no foren els més òptims, o que a l'hora de l'execució del procés un mínim error provocara una baixa d'eficiència.

Amb tot, finalment, només es va obtindre la construcció que s'il·lustra a la **figura 20**.



**Figura 20. Representació esquemàtica de la construcció aconseguida mitjançant GoldenBraid.** pUPD<sub>2</sub>: plasmidi UPD<sub>2</sub>; GR: promotor del gen del glucocorticoides.

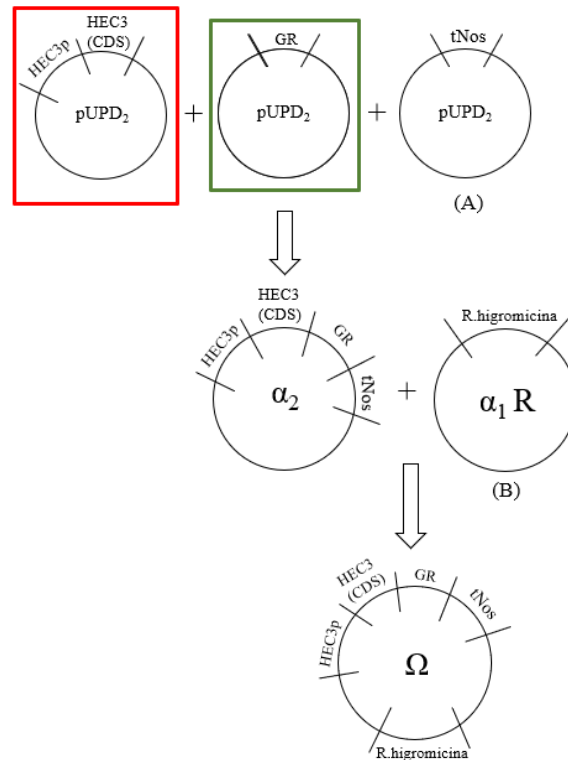
No obstant això, encara es requereixen de més passos per a poder aconseguir la construcció que es desitjava, HEC3p:HEC3(CDS):GR.

### 4.3.1 Projeccions futures

La falta de temps sobretot ha conduït a que no s'haja pogut completar l'objectiu de clonació mitjançant la tecnologia GoldenBraid, però aquest projecte ja s'ha posat en marxa i pròximament serà una realitat.

Per això, amb la vista posada en el futur, es van a especificar els procediments que s'han de dur a terme per tal de completar el procés.

A la **figura 21** s'adjunta un esquema complet d'allò aconseguit i el que falta per a dur a terme.



**Figura 21. Representació esquemàtica del resum final de la clonació d'HEC3p:HEC3(CDS):GR, mitjançant GoldenBraid.** (A) Construcció depositada en [https://www.addgene.org/Diego\\_Orzaez](https://www.addgene.org/Diego_Orzaez) (referència GB0037). (B) Construcció depositada en [https://www.addgene.org/Diego\\_Orzaez](https://www.addgene.org/Diego_Orzaez) (referència GB0235). HEC3p: promotor d'HECAT3; HEC3(CDS): CDS d'*HECATE*; pUPD<sub>2</sub>: plasmidi UPD<sub>2</sub>;  $\alpha_2$ : plasmidi tipus  $\alpha_2$ ;  $\alpha_2R$ : plasmidi tipus  $\alpha_2$  revers;  $\Omega$ : plasmidi tipus  $\Omega$ ; tNos: terminador del gen NOS d'*Agrobacterium tumefaciens*; R.higromicina: gen de resistència a higromicina. El quadre en verd representa la construcció aconseguida en el present treball. El quadre en roig representa la construcció no aconseguida en el present treball.

Amb tot, primerament s'hauria d'obtenir la construcció requadrada en roig, perfeccionant les característiques del procediment, i també aconseguir la mostra (A) a partir del depòsit de plasmidis de Diego Orzáez ([https://www.addgene.org/Diego\\_Orzaez/](https://www.addgene.org/Diego_Orzaez/)).

Després, els fragments insertats en les dos construccions descrites anteriorment i la ja aconseguida a aquest treball es clonarien en el plasmidi  $\alpha_2$ .

La fracció incorporada (HEC3p:HEC3(CDS):GR:tNos) seria a continuació clonada en un plasmidi  $\Omega$ , juntament amb el gen de resistència a higromicina, procedent del plasmidi aconseguit del depòsit de plasmidis ([https://www.addgene.org/Diego\\_Orzaez/](https://www.addgene.org/Diego_Orzaez/)) (B).

Com ja s'ha mencionat anteriorment, la informació necessària per a dur a terme el procés seria facilitada pel programa GoldenBraid.

Amb la construcció ja aconseguida, es procediria a la infiltració de la mateixa en plantes per tal d'obtenir les conseqüències de la seua expressió, i per a identificar en estudis posteriors gens regulats per *HECATE3*

### **Alternativa: In-Fusion®**

Una alternativa a la clonació mitjançant GoldenBraid serien els sistemes per PCR In-Fusion. Aquests permeten la clonació direccional de qualsevol fragment de PCR, o de fragments múltiples, en qualsevol vector linealitzat amb alta precisió i fidelitat.

Són diversos els avantatges que tenen aquests sistemes, i els que els converteixen en uns mètodes molt versàtils i efectius. Entre els més importants, i els que els diferencien de la resta, es troben:

- No es requereix tractament addicional de fragments de PCR
- No hi ha subclonació (s'obté la construcció final en pocs dies)
- La clonació de múltiples fragments té un rendiment d'entre 90-100%
- No queden pars de bases addicionals

No obstant això, és una opció cara, és a dir, és necessària una quantitat elevada de diners per a poder adquirir els reactius que s'usarien en el procés.

El sistema In-Fusion, per tant, és una alternativa de clonació al GoldenBraid que podria permetre la obtenció de la construcció final desitjada.



## 5. CONCLUSIONS

A partir dels resultats i la discussió realitzada es conclou que:

- Les plantes d'*Arabidopsis thaliana hec1hec2hec3ind* continuen duent a terme la dispersió del pol·len
- A banda dels gens *HECATE* i *INDEHISCENT*, són més els involucrats en la dehiscència de les anteres d'*Arabidopsis thaliana*
- La construcció HEC3p:HEC3(CDS):GR, mitjançant GoldenBraid, no s'ha completat
- La clonació del GR en el plasmidi UPD<sub>2</sub>, mitjançant GoldenBraid, ha resultat exitosa
- El sistema de clonació In-Fusion és una alternativa efectiva futura per a aconseguir la construcció HEC3p:HEC3(CDS):GR

## 6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- ALVAREZ, J., & SMYTH, D. R.** (1999). CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development (Cambridge, England)*, 126(11), 2377–2386.
- BALANZÀ, V., ROIG-VILLANOVA, I., DI MARZO, M., MASIERO, S., & COLOMBO, L.** (2016). Seed abscission and fruit dehiscence required for seed dispersal rely on similar genetic networks. *Development (Cambridge, England)*, 143(18), 3372–3381.
- BENJAMINS, R., QUINT, A., WEIJERS, D., HOOYKAAS, P., & OFFRINGA, R.** (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport. *Development (Cambridge, England)*, 128(20), 4057–4067.
- CHENG, Y., DAI, X., & ZHAO, Y.** (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes & development*, 20(13), 1790–1799.
- DAI, S. Y., HSU, W. H., & YANG, C. H.** (2019). The Gene ANTHHER DEHISCENCE REPRESSOR (ADR) Controls Male Fertility by Suppressing the ROS Accumulation and Anther Cell Wall Thickening in Arabidopsis. *Scientific reports*, 9(1), 5112.
- ELLENBERGER, T., FASS, D., ARNAUD, M., & HARRISON, S. C.** (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes & development*, 8(8), 970–980.
- FERRÁNDIZ C.** (2002). Regulation of fruit dehiscence in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 53(377), 2031–2038.
- FERRÉ-D'AMARÉ, A. R., POGNONEC, P., ROEDER, R. G., & BURLEY, S. K.** (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *The EMBO journal*, 13(1), 180–189.
- GAILLOCHET, C., JAMGE, S., VAN DER WAL, F., ANGENENT, G., IMMINK, R., & LOHMANN, J. U.** (2018). A molecular network for functional versatility of HECATE transcription factors. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 95(1), 57–70.
- GAILLOCHET, C., STIEHL, T., WENZL, C., RIPOLL, J. J., BAILEY-STEINITZ, L. J., LI, L., PFEIFFER, A., MIOTK, A., HAKENJOS, J. P., FORNER, J., YANOFSKY, M. F., MARCINIAK-CZOCRA, A., & LOHMANN, J. U.** (2017). Control of plant cell fate transitions by transcriptional and hormonal signals. *eLife*, 6, e30135.
- GIRIN, T., PAICU, T., STEPHENSON, P., FUENTES, S., KÖRNER, E., O'BRIEN, M., SOREFAN, K., WOOD, T. A., BALANZÀ, V., FERRÁNDIZ, C., SMYTH, D. R., & ØSTERGAARD, L.** (2011). INDEHISCENT and SPATULA interact to specify carpel and valve margin tissue and thus promote seed dispersal in Arabidopsis. *The Plant cell*, 23(10), 3641–3653.
- GOLDBERG, R. B., BEALS, T. P., & SANDERS, P. M.** (1993). Anther development: basic principles and practical applications. *The Plant cell*, 5(10), 1217–1229.
- GREMSKI, K., DITTA, G., & YANOFSKY, M. F.** (2007). The HECATE genes regulate female reproductive tract development in Arabidopsis thaliana. *Development (Cambridge, England)*, 134(20), 3593–3601.
- HEISLER, M. G., ATKINSON, A., BYLSTRA, Y. H., WALSH, R., & SMYTH, D. R.** (2001). SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development (Cambridge, England)*, 128(7), 1089–1098.

- KUHN, A., RUNCIMAN, B., TASKER-BROWN, W., & ØSTERGAARD, L.** (2019). Two Auxin Response Elements Fine-Tune *PINOID* Expression During Gynoecium Development in *Arabidopsis thaliana*. *Biomolecules*, 9(10), 526.
- LARSSON, E., FRANKS, R. G., & SUNDBERG, E.** (2013). Auxin and the *Arabidopsis thaliana* gynoecium. *Journal of experimental botany*, 64(9), 2619–2627.
- LEE, B. H., KWON, S. H., LEE, S. J., PARK, S. K., SONG, J. T., LEE, S., LEE, M. M., HWANG, Y. S., & KIM, J. H.** (2015). The *Arabidopsis thaliana* NGATHA transcription factors negatively regulate cell proliferation of lateral organs. *Plant molecular biology*, 89(4-5), 529–538.
- LILJEGREN, S. J., ROEDER, A. H., KEMPIN, S. A., GREMSKI, K., ØSTERGAARD, L., GUIMIL, S., REYES, D. K., & YANOFSKY, M. F.** (2004). Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by INDEHISCENT. *Cell*, 116(6), 843–853.
- MA H.** (1994). The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analyses. *Genes & development*, 8(7), 745–756.
- MURRE, C., MCCAWE, P. S., & BALTIMORE, D.** (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, 56(5), 777–783.
- OKADA, K., UEDA, J., KOMAKI, M. K., BELL, C. J., & SHIMURA, Y.** (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of *Arabidopsis* Floral Bud Formation. *The Plant cell*, 3(7), 677–684.
- ORTIZ-RAMÍREZ, C. I., PLATA-ARBOLEDA, S., & PABÓN-MORA, N.** (2018). Evolution of genes associated with gynoecium patterning and fruit development in Solanaceae. *Annals of botany*, 121(6), 1211–1230.
- PABÓN-MORA, N., WONG, G. K., & AMBROSE, B. A.** (2014). Evolution of fruit development genes in flowering plants. *Frontiers in plant science*, 5, 300.
- PFANNEBECKER, K. C., LANGE, M., RUPP, O., & BECKER, A.** (2017). Seed Plant-Specific Gene Lineages Involved in Carpel Development. *Molecular biology and evolution*, 34(4), 925–942.
- PRUNET, N., MOREL, P., NEGRUTIU, I., & TREHIN, C.** (2009). Time to stop: flower meristem termination. *Plant physiology*, 150(4), 1764–1772.
- RÉDEI G. P.** (1962). Supervital Mutants of *Arabidopsis*. *Genetics*, 47(4), 443–460.
- REYES-OLALDE, J. I., ZUÑIGA-MAYO, V. M., CHÁVEZ MONTES, R. A., MARSCH-MARTÍNEZ, N., & DE FOLTER, S.** (2013). Inside the gynoecium: at the carpel margin. *Trends in plant science*, 18(11), 644–655.
- ROBLES, P., & PELAZ, S.** (2005). Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *The International journal of developmental biology*, 49(5-6), 633–643.
- ROEDER, A. H., & YANOFSKY, M. F.** (2006). Fruit development in *Arabidopsis*. *The arabidopsis book*, 4, e0075.
- SARRION-PERDIGONES, A., FALCONI, E. E., ZANDALINAS, S. I., JUÁREZ, P., FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A., GRANELL, A., & ORZAEZ, D.** (2011). GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS one*, 6(7), e21622.

- SARRION-PERDIGONES, A., PALACI, J., GRANELL, A., & ORZAEZ, D.** (2014). Design and construction of multigenic constructs for plant biotechnology using the GoldenBraid cloning strategy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1116*, 133–151.
- SCHUSTER, C., GAILLOCHET, C., MEDZIHRAZSKY, A., BUSCH, W., DAUM, G., KREBS, M., KEHLE, A., & LOHMANN, J. U.** (2014). A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals. *Developmental cell*, *28*(4), 438–449.
- SCHUSTER, C., GAILLOCHET, C., & LOHMANN, J. U.** (2015). Arabidopsis HECATE genes function in phytohormone control during gynoecium development. *Development (Cambridge, England)*, *142*(19), 3343–3350.
- SCUTT, C. P., VINAUGER-DOUARD, M., FOURQUIN, C., FINET, C., & DUMAS, C.** (2006). An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *Journal of experimental botany*, *57*(10), 2143–2152.
- SESSIONS, A., NEMHAUSER, J. L., MCCOLL, A., ROE, J. L., FELDMANN, K. A., & ZAMBRYSKI, P. C.** (1997). ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development (Cambridge, England)*, *124*(22), 4481–4491.
- SESSIONS, R. A., & ZAMBRYSKI, P. C.** (1995). Arabidopsis gynoecium structure in the wild and in ettin mutants. *Development (Cambridge, England)*, *121*(5), 1519–1532.
- SMYTH, D. R., BOWMAN, J. L., & MEYEROWITZ, E. M.** (1990). Early flower development in Arabidopsis. *The Plant cell*, *2*(8), 755–767.
- SOREFAN, K., GIRIN, T., LILJEGREN, S. J., LJUNG, K., ROBLES, P., GALVÁN-AMPUDIA, C. S., OFFRINGA, R., FRIML, J., YANOFSKY, M. F., & ØSTERGAARD, L.** (2009). A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in Arabidopsis. *Nature*, *459*(7246), 583–586.
- TOLEDO-ORTIZ, G., HUQ, E., & QUAIL, P. H.** (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant cell*, *15*(8), 1749–1770.
- TRIGUEROS, M., NAVARRETE-GÓMEZ, M., SATO, S., CHRISTENSEN, S. K., PELAZ, S., WEIGEL, D., YANOFSKY, M. F., & FERRÁNDIZ, C.** (2009). The NGATHA genes direct style development in the Arabidopsis gynoecium. *The Plant cell*, *21*(5), 1394–1409.
- WILSON, Z. A., SONG, J., TAYLOR, B., & YANG, C.** (2011). The final split: the regulation of anther dehiscence. *Journal of experimental botany*, *62*(5), 1633–1649.
- ZÚÑIGA-MAYO, V. M., GÓMEZ-FELIPE, A., HERRERA-UBALDO, H., & DE FOLTER, S.** (2019). Gynoecium development: networks in Arabidopsis and beyond. *Journal of experimental botany*, *70*(5), 1447–1460.