

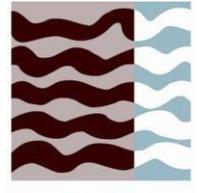


Universidad
Politécnica
de Cartagena



UPCT

**Escuela Técnica Superior de
Ingeniería Agronómica**



ETSIA

***Grado en Ingeniería Agroalimentaria
y de Sistemas Biológicos***

**Optimización de protocolos de
transformación vegetal en plantas
modelo para la aplicación de la
tecnología Crispr/Cas**

Autora: Dña. Candela Fernández Donas

Dirección: Dña. Julia Rosl Weiss

Codirección: D. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Cartagena, abril de 2022

*“Podemos tener ideas fantásticas, pero si no sabemos cómo llevarlas a cabo nunca podremos
progresar”.*

Sydney Brenner, Premio Nobel de Medicina (2002)

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora de proyecto Dña Julia Rosl Weiss y codirector D.Marcos Egea Gutiérrez-Cortines, dos profesionales en el campo de la mejora genética que me han guiado a lo largo de todo el trabajo a la vez que me han demostrado la importancia de la actitud y ganas con la que podemos hacer cualquier cosa en nuestra vida.

También agradecer a todos los compañeros con los que compartí laboratorio durante mis prácticas en el Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) del edificio I+D+i de la Universidad Politécnica de Cartagena en donde trabajé para obtener los resultados de la investigación.

A mis compañeros de grado por hacer estos años de Universidad tan especiales y divertidos.

Y finalmente a mi familia y amigos, a Alejandro por todas esas tardes intensivas de estudio, a Marita por confiar en mi cuando ni yo misma lo hacía y a mis padres y hermano por ayudarme a ser la persona que soy ahora.

Gracias por haberme dado la fuerza y el cariño durante todos estos años.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Importancia de la transformación de las plantas en la mejora vegetal y para el estudio de función de genes.....	3
1.1.1 Desarrollo de la ingeniería genética.....	6
1.1.2 Genética inversa.....	7
1.1.3 Plantas modelo en investigación científica	8
1.2 La técnica Crispr/Cas como método para crear mutaciones “knock out”	9
1.2.1 Origen de las herramientas de edición genética Crispr.	9
1.2.2 Empleo de las herramientas Crispr.....	11
1.3 Infección de plantas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
1.3.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
1.3.2 Breve resumen del protocolo general de transformación con <i>Agrobacterium</i>	18
1.3.3 Relevancia del gen <i>GIGANTEA</i>	19
1.3.4 Métodos de control de infección en las placas	20
1.4 Regeneración de tejidos transformados	23
1.4.1 Producción de callos in vitro y genes analizados.....	23
1.4.2 Análisis de genes	25
1.4.3 Medición del nivel de expresión con PCR cuantitativa.....	27
2.OBJETIVOS.....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 Material vegetal, cepas de <i>Agrobacterium</i> y plásmido binario.....	29
3.2 Metodología empleada para transformar plantas de <i>Petunia hybrida</i> y <i>Nicotiana benthamiana</i>	30
3.2.1 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 con el plásmido pBIN Crispr/Cas9-GI.....	31
3.2.1.1 Comprobación de la Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
3.2.2 Infección de hojas de <i>Petunia hybrida</i> y <i>Nicotiana benthamiana</i> con los <i>A.tumefaciens</i> recombinantes.....	33
3.3 Evaluación de genes relacionados con el desarrollo de callos en <i>Antirrhinum majus</i>	36
3.3.1 Extracción de ARN	38
3.3.2 Transcripción de ARN a ADN de copia	38
3.3.3 PCR Cuantitativa	38

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1 Optimización del cultivo in vitro tras la transformación de <i>Agrobacterium</i> en <i>Petunia</i> y <i>Nicotiana</i>.	39
4.2 Análisis de niveles de expresión en genes candidatos involucrados en el desarrollo de callos de <i>Antirrhinum</i>:	43
5. CONCLUSIONES	45
6. BIBLIOGRAFIA	47
7. WEBGRAFÍA	51
ANEXO I	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación del cruzamiento clásico versus Ingeniería genética. Fuente: (Muntada, 2022).....	4
Figura 2. Representación de la incorporación de la secuencia espaciadora en el genoma de una bacteria. Fuente: Artículo de “La revolución en ingeniería genética sistema Cris (Lammoglia_Cobo et al-2016).....	11
Figura 3. Componentes principales para diseñar sistema CRISPR. Fuente: Addgene: (Guía CRISPR, 2022)	12
Figura 4. Generación de un Knockout usando CRISPR Fuente: Addgene: Guía (CRISPR, 2022)	13
Figura 5. Formación del complejo CRISPR/Cas. Fuente: Addgene: Guía (CRISPR, 2022).....	14
Figura 6. Esquema de la infección de Agrobacterium a células vegetales. (Fuente: Goldbio, 2022)	16
Figura 7. Esquema de la composición de un vector Binario y el plásmido de ayuda. (Fuente: goldbio, 2022)17	
Figura 8. Estructura de Cefotaxima. Fuente. (Brouwers et al., 2020)	22
Figura 9. Inducción de callos y regeneración de plantas en cultivo in vitro de distintos explantes en cuatro especies de dicotiledóneas herbáceas. Fuente: (Mroginski y Roca,1991).....	25
Figura 10. Plásmido de Nicotiana bentamiana para el gen de GIGANTEA Fuente: Addgene: Guía(CRISPR, 2022).....	30
Figura 11. Amplificación del ADN correspondiente al ARN guía del plásmido pBIN Crispr/Cas9-Gi de Petunia hybrida con cebadores Alu6 for y Scaf rev. Extraído de E.coli. Control positivo:plásmido Puc119; Control negativo: H2O.....	32
Figura 12. Placas de co-cultivación después de la infección con Agrobacterium y el lavado con cefotaxima en caso del Exp A.	34
Figura 13 . Bolsas de semillas de las variedades seleccionadas y callos de Antirrhinum majus var.Royal Bridey y Antirrhinum majus var Antirrhinum Lucky Lips.	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de Cultivo para realizar las transformaciones.....	35
Tabla 2. Medios de cultivo empleados para el desarrollo de callos de Antirrhinum majus	36
Tabla 3. Resultados de las hojas de Petunia hybrida transformadas	39
Tabla 4. Resultados de las hojas de Nicotiana benthamiana transformadas.....	42
Tabla 5. Expresión relativa delta t de genes candidatos en callos de 3 variedades de Antirrhinum majus	43

ABREVIATURAS

μl: microlitro

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ADN-T: ADN de Transferencia

AL5: Aintegumenta-like 5

BAP: 6-Bencilaminopurina

BER: Alta fiabilidad de escisión de bases

CNB-CSIC: Grupo de Investigación del centro Nacional de Biotecnología

CO: CONSTANS

CRF 3: Factor de Respuesta a Citoquinina

CRISPR: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas”
(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

CyclinD 3;1(CYC)

GI: GIGANTEA

IAA: ácido indol-3-acético

MIC: Concentración Inhibidora mínima

NAA: Ácido 1-naftalenacético

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

OMG: Organismo Modificado Genéticamente

RNAi: RNA de interferencia

RT- PCR: reverse-transcriptase-PCR

RESUMEN

CRISPR/CAS es una tecnología innovadora que ha permitido realizar numerosos avances en el mundo de la investigación gracias a su capacidad de insertar y alterar ADN con precisión. La técnica de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* es muy utilizada para introducir la construcción Crispr/Cas en células de plantas. Para la optimización del protocolo de transformación se eligieron tres especies modelo; *Petunia hybrida*, *Nicotiana benthamiana*, y *Antirrhinum majus*. El éxito de la transformación planteada en este trabajo provocará una mutación en el gen *GIGANTEA*, un gen con diversas funciones sobre caracteres de interés agronómico como el tiempo de floración o el crecimiento vegetativo. Aunque existen protocolos para la transformación de estas especies, el proceso de regeneración *in vitro* de plantas transgénicas puede ser perjudicado por contaminaciones o una baja producción de callos, tallos y raíces. Para reducir futuros problemas causados por dichos aspectos, los objetivos del trabajo se centraron en mejorar el proceso de transformación y cultivo *in vitro* de plantas modelo de *Nicotiana benthamiana* y *Petunia hybrida* y en evaluar posibles genes candidatos involucrados en la formación de callos por RT-PCR. Estos genes podrían servir como marcadores moleculares para la selección de variedades optimizadas para la transformación. Como resultado del presente trabajo se observó que la aplicación del antibiótico cefotaxima en forma de un lavado de hojas a los dos días de la infección disminuyó las contaminaciones y aumentó la formación de callos, aunque restringía el desarrollo de tallos y raíces. La expresión de genes marcadores no manifestó diferencias significativas en la expresión génica entre variedades de *Antirrhinum majus* con un desarrollo diferencial del callo. Por lo tanto, los genes estudiados no pudieron considerarse como marcadores del nivel de crecimiento del callo en *Antirrhinum*.

ABSTRACT

CRISPR/CAS is an innovative technology that has enabled numerous advances in the world of research thanks to its ability to precisely insert and alter DNA. The *Agrobacterium tumefaciens* transformation technique is widely used to introduce the Crispr/Cas into plant cells. Three model species; *Petunia hybrida*, *Nicotiana benthamiana*, and *Antirrhinum majus* were chosen to optimize the transformation protocol. The success of the transformation proposed in this work will cause a mutation in the GIGANTEA gene, a gene with various functions on traits of agronomic interest such as flowering time or vegetative growth. Although there are protocols for the transformation of these species, in vitro regeneration process of transgenic plants can be damaged by pollution or low production of calluses, stems and roots. The objectives of the work were focused on improving the transformation process and in vitro cultivation of model plants of *Nicotiana benthamiana* and *Petunia hybrida* and on evaluating possible genes involved in callus formation by RT-PCR in order to reduce future problems caused by them. These genes could serve as molecular markers for the selection of varieties optimized for transformation. Through this investigation, it was observed that the use of the antibiotic cefotaxime in form of a leaf washing at two days after infection, decreased contamination and increased callus formation although it restricted the development of stems and roots. The expression of marker genes did not show significant differences in gene expression between varieties of *Antirrhinum majus* with differential callus development. Therefore, the genes studied could not be considered as markers of the level of callus growth in *Antirrhinum*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la transformación de las plantas en la mejora vegetal y para el estudio de función de genes.

Desde el comienzo de los tiempos el hombre empezó a realizar de forma inconsciente actividades que fueron cambiando la composición genética de muchas variedades vegetales, dando lugar a nuevas especies de plantas más fáciles de manejar para la civilización. Estas actividades de mejora marcaron el desarrollo de la humanidad ya que fue uno de los principales factores que permitió pasar de una sociedad nómada a una sociedad organizada y cooperativa. Inicialmente las técnicas de mejora eran muy rudimentarias, se hacían sin fundamentos científicos, juntando aquellas variedades cuyas características fenológicas mostrarán más interés según las necesidades que presentarán los humanos en aquel momento histórico. Sin embargo, desde la aparición de las leyes de Mendel, las técnicas de mejora fueron teniendo más base científica y han avanzado hasta la gran cantidad de herramientas de mejora de las que disponemos en la actualidad (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Para entender la importancia que tiene generar plantas transgénicas en la mejora vegetal a la hora de estudiar la función de determinados genes es necesario conocer los siguientes conceptos:

-Mejora Genética clásica:

Se refiere al proceso de optimización de cualidades fenotípicas de los individuos sin el empleo de herramientas genéticas. Este método ha sido la técnica más antigua y rudimentaria de modificación de organismos, se llevaba a cabo sin muchos conocimientos científicos y se basa principalmente en la herencia génica (Fig.1) (Horsch, 1985).

-Mejora Genética moderna:

Es el mecanismo de estudio génico actual que se desarrolló a través de los principios básicos de la herencia genética asentados por Mendel. La mejora genética moderna es un concepto más complejo que se centra en la optimización fenotípica y genotípica llevada a cabo mediante numerosas técnicas de mejora, entre las que destacan; retrocruzamientos, métodos de selección masal, empleo de ADN recombinante... etc (Fig.1) (Rubio Gardiel, 1973).

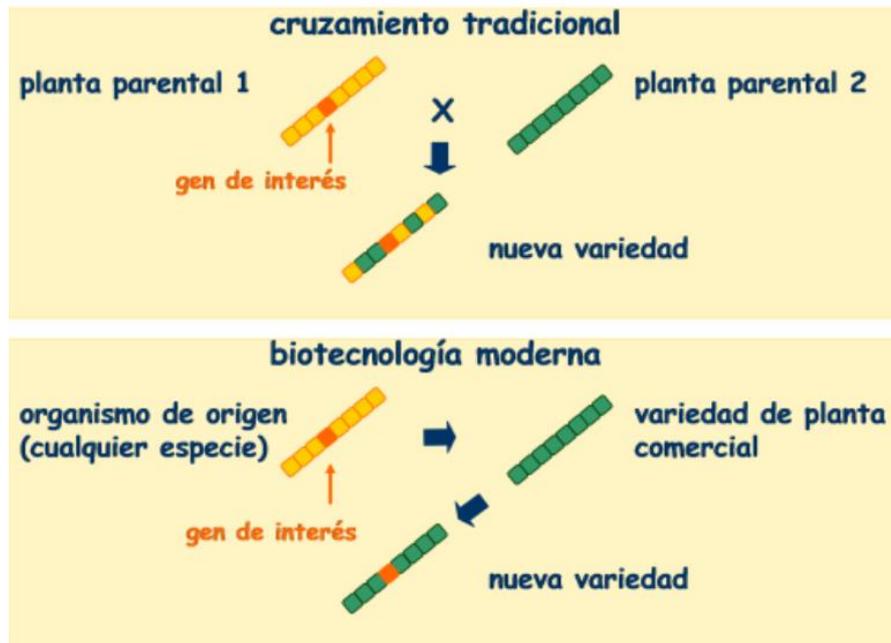


Figura 1. Comparación del cruzamiento clásico versus Ingeniería genética. Fuente: (Muntada, 2022)

-Ingeniería Genética;

También conocida como “Tecnología del ADN recombinante” es un conjunto de técnicas cuyo resultado final nos proporcionará una serie de genotipos que expresan características de interés mediante la integración de un fragmento de ADN foráneo. Dicho gen que se incorpora al organismo desde fuera recibe el nombre de transgén y aquel organismo modificado genéticamente resultante transgénico (OMG).

Como ventaja en el empleo de ingeniería genética encontramos que esta nos permite trabajar con genes presentes en especies que no están relacionadas entre sí e incluso de géneros y reinos diferentes. Otra de sus ventajas es la facilidad que otorga a la hora de incorporar las características que queremos implantar en un genoma, puesto que al traspasar pocos genes al genoma vegetal no es necesario recurrir a retrocruzamientos, proceso que resulta largo y costoso. Todo esto es posible gracias a la correcta transformación de la planta que se consigue empleando herramientas y métodos especializados que manipulan el material genético de los organismos (Horsch, 1985)

El empleo y desarrollo de las técnicas usadas en ingeniería genética han supuesto una revolución en la historia de la ciencia ya que además de causar efecto en áreas como son la Biomedicina, Biotecnología y Biología, también abarca otros muchos campos sociales, como la alimentación, economía y justicia (Gómez-Márquez, 2013).

-Transformación de plantas;

Entendemos la transformación de plantas como el correcto proceso de incorporación de genes foráneos mediante diversas herramientas y la correcta expresión de estos genes sin que se lleguen a modificar las cualidades agronómicas y de mercado de los cultivos. Los sistemas de transformación en plantas resultan más complicados que en animales. Aquellas herramientas con las que modificamos genéticamente las plantas se pueden clasificar en métodos directos, producidos por elementos físicos, y métodos indirectos, cuya alteración se debe al empleo de vectores biológicos (Horsch, 1985).

- a) Métodos directos: Se emplean en aquellas especies que no responden bien a la transformación por *Agrobacterium tumefaciens*. Dentro de este tipo de técnicas podemos encontrar; (LA BIOTECNIA, 1994)

-Absorción directa del ADN a través del uso de protoplastos.

-Electroporación, perforación de la membrana nuclear de las células a través de pulsos nerviosos con un voltaje alto para introducir ADN foráneo en el interior de una célula. Con el tiempo la pared celular se regenerará y continuará con su crecimiento natural. Esta técnica es muy utilizada sobre todo para transformar células animales.

-Microproyectiles, también se conoce como biobalística, es el método de transferencia directa más común para transformar plantas vegetales. Consiste en transferir genes al interior de una célula empleando una especie de pistola que expulsará en condiciones de vacío pequeñas partículas que se encuentran cubiertas de moléculas de ADN.

-Microinyección, su frecuencia de transformación es un éxito en embriones unicelulares de animales, pero resulta muy baja en plantas transformadas.

- b) Métodos indirectos; Se basa en el empleo de vectores para conseguir las transformaciones. El vector más utilizado por las características que presenta es la bacteria de suelo *Agrobacterium tumefaciens*. Una vez que el vector disponga del gen de interés en su interior, se introducirá el vector en la célula vegetal para que lo incorpore a su genoma. Es muy importante que el material genético que se va a introducir a la planta contenga todos los elementos reguladores que permitan la correcta expresión de los genes introducidos. Otro tipo de vectores de trabajo en los métodos de transformación indirectos son los virus de ADN tanto de cadena doble y simple, y algunos tipos de hongos. Una ventaja característica es que nos permite

introducir de forma rápida genes particulares que hayan sido identificados y definidos sus características, dentro de una variedad que se desee mejorar (LA BIOTECNIA, 1994)

Los más utilizados actualmente se centran en producir plantas transgénicas para generar plantas completas y fértiles mediante el cultivo de tejidos y selección *in vitro* (proceso que hemos hecho en el laboratorio para obtener los resultados de los experimentos) (Horsch, 1985).

-Plantas transgénicas:

Etimológicamente, el prefijo “trans” significa; atravesar, sobrepasar, por eso transgénico hace alusión a la introducción de un gen extraño en un organismo, el cual modificará genéticamente, los genes que se transfieren se denominan transgenes. Dicho esto, una planta transgénica es una variedad vegetal que ha crecido y se ha desarrollado con un fragmento de ADN de una célula foránea, introducido en una de sus células mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética que aíslan segmentos de ADN de un ser vivo el cual puede ser un virus, bacteria, organismo vegetal, animal o incluso humano. Por lo tanto, las plantas transgénicas, también llamadas plantas modificadas tendrán uno o varios genes insertados de forma artificial en un laboratorio y no por cruzamiento como ocurriría de forma natural (Cabrera-Ponce and Irapuato, n.d.).

1.1.1 Desarrollo de la ingeniería genética

Los primeros pasos que se dieron en el campo de la producción de plantas transgénicas fue en los años ochenta gracias al descubrimiento del importante papel que desempeña *Agrobacterium tumefaciens* para transferir ADN entre reinos puesto que tienen la capacidad de acoplar su material genético dentro del genoma del hospedador (Valderrama, 2005).

Durante 1983 se consiguió desarrollar en laboratorios células de plantas de tabaco y de petunia que presentaban resistencia a kanamicina, un antibiótico de amplio espectro bactericida, por aquel entonces también se consiguió insertar en una planta de girasol un gen procedente del frijol. En 1995 después de años de experimentos se comenzaron a desarrollar los primeros cultivos transgénicos y en 2010 más de 15,4 millones de agricultores sembraron en 29 países 148 millones de ha de cultivos transgénicos. Desde los años ochenta hasta la actualidad se ha conseguido transformar más de 120 especies vegetales y 35 familias diferentes (Granados and Giraldo, 2012).

1.1.2 Genética inversa

El hecho de que cada vez se invierta más en estudios y experimentos acerca del desarrollo de plantas transgénicas se debe a los numerosos descubrimientos y campos en los que permite avanzar a nivel de investigación para mejorar la calidad de vida de las personas. Por ejemplo, gracias a las plantas transgénicas se pueden desarrollar nuevas variedades de vegetales que contengan características importantes a la hora de resistir frente a determinados factores y favorecer su calidad y rendimiento frente a una explotación agraria. También toca temas de entidad sanitaria permitiendo la fabricación de vacunas y otras sustancias terapéuticas (Granados and Giraldo, 2012).

Sin embargo, el aspecto más importante que permite desarrollar el empleo de plantas transgénicas y en los que se basa el fundamento de los experimentos expuestos en este trabajo de investigación se deben a que nos permite descifrar procesos biológicos claves importantes para la vida ya que, aunque es menos conocida esta relación, las plantas transgénicas son muy importantes en los estudios científicos destinados a determinar la funcionalidad de ciertos genes. El proceso más común por el cual se descifra la importancia que tiene un gen en concreto es el “análisis clásico” que consiste en observar el mutante de una especie y mediante estrategias, relacionar el fenotipo mutante con un gen particular (genética inversa). Por otro lado, con el empleo de plantas transgénicas también podemos conocer cómo afectan los genes en los organismos, mediante una técnica inversa a la descrita, esta técnica se conoce como “genética inversa”. La “genética inversa” identificará la función de un gen aislándolo y observando el fenotipo que se produce al desarrollarse la planta transgénica. Debido a que se ha alterado la actividad normal del gen se producirá una sobreexpresión o silenciamiento de este, esto se consigue gracias a la fuerte especificidad que ofrece la herramienta CRISPR/Cas permitiendo elegir con este la ubicación específica del genoma que se pretende estudiar (Huanca-Mamani, 2013).

A través de la información que podemos obtener trabajando con plantas transgénicas en investigaciones se han hecho importantes avances a nivel molecular. Esto ha permitido conocer el circuito de genes encargados de la regulación de la transición floral y del desarrollo de diferentes partes de una planta como lo son las flores y el fruto, lo que nos facilita a nivel productivo, planificar las cosechas con mayor precisión y modificar determinados caracteres, entre ellos; valor nutritivo, color aroma...etc. Pero no solo eso, la identificación de genes en procesos vitales importantes como la embriogénesis, formación de gametos, hojas y diferenciación de hojas y tallos, así como la respuesta de estos ante situaciones de estrés abiótico como la salinidad, sequía, frío o la existencia de metales pesados nos permitirá

establecer sus bases científicas y conocer los mecanismos que los regulan (Huanca-Mamani, 2013).

El estudio de la función de genes mediante el desarrollo de plantas transgénicas también se consigue con una técnica conocida como RNAi (RNA de interferencia), con este método las plantas transformadas incorporarán una construcción que produce moléculas específicas de RNA de cadena doble que inhibirán de manera selectiva la expresión de genes endógenos (Guo *et al.*, 2016).

Otras posibles aplicaciones de CRISPR; Activador o represor de la expresión génica, generación de modelos animales creando animales modificados genéticamente y tratamientos de arreglo cromosomal a través de la fusión de genes para el estudio de terapias con cáncer (Lammoglia-Cobo *et al.*, 2016).

1.1.3 Plantas modelo en investigación científica

A la hora de realizar experimentos de genética inversa han sido numerosas las especies vegetales tratadas en laboratorios como muestra de estudio. En la selección del modelo de trabajo se tendrá en cuenta la sencillez del organismo, tiempo de crecimiento, fácil manejo, buen comportamiento al procedimiento al que se verá sometido y sobre todo, la información conocida procedente de estudios anteriores que ayudará a comparar resultados de la muestra y sacar conclusiones. Por ello *Petunia hybrida*, *Nicotiana benthamiana* y *Antirrhinum majus* son especies modelo usadas comúnmente en experimentos.

- *Petunia hybrida*

Una planta que ha servido como modelo en numerosas investigaciones científicas a lo largo del tiempo ha sido *Petunia hybrida*, su popularidad surgió a raíz del descubrimiento del RNAi y dispone de gran cantidad de información acerca de sus técnicas de transformación génica y comportamiento que muestra debido a lo bien que responde su manejo en condiciones de laboratorio. (Mallona *et al.*, 2010).

- *Nicotiana benthamiana*

Es una variedad de planta de tabaco más pequeña que la famosa y comúnmente comercializada *Nicotiana tabacum*. Originaria del desierto australiano se ha convertido en el sistema modelo más utilizado para entender el comportamiento de los virus en las plantas. Funciona como un huésped experimental en virología vegetal debido a la enorme susceptibilidad que presenta *Nicotiana benthamiana* ante diversas bacterias, hongos y otros

patógenos. Además, su eficiente transformación y regeneración genética, así como su sólida compatibilidad ante el empleo de métodos sencillos para el silenciamiento génico inducido por virus o expresión transitoria de proteínas le ha permitido abrirse camino en estudios sobre la localización e interacción de proteínas y su empleo en sistemas de expresión y purificación proteica. Gracias a todas estas características se ha convertido en una importante herramienta en los campos de investigación de inmunidad innata y señalización de defensa principalmente (Goodin et al., 2008).

- *Antirrhinum majus*

Es una planta ornamental también conocida como “Cabeza de dragón” empleada comúnmente en jardinería. Fundamentalmente se utiliza como planta modelo en estudios sobre emisión de compuestos volátiles de flores, síntesis de pigmentos, desarrollo floras y ritmo circadiano (Terry López et al., 2016)

1.2 La técnica Crispr/Cas como método para crear mutaciones “knock out”

1.2.1 Origen de las herramientas de edición genética Crispr.

Los datos y resultados expuestos en el siguiente trabajo de investigación se centran en gran medida en la optimización de los protocolos de transformación vegetal con *Agrobacterium tumefaciens* para la inducción de una mutación en un gen específico, aplicando la técnica Crispr/Cas, pero antes de discutirlos y analizarlos vamos a ver cómo surgieron, en qué consiste y la importancia de las herramientas CRISPR en edición genética.

CRISPR es el acrónimo de “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas” (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), estas repeticiones funcionan como un almacén de memoria de infecciones que sufren las bacterias frente a virus bacteriófagos y así lo utilizan para reconocer estos agentes infecciosos y destruirlos, es decir funciona como un sistema de inmunidad adquirida. Gracias a Crispr hoy en día conseguimos modificar genéticamente plantas, animales y humanos en un laboratorio básico y de forma muy sencilla. Todo esto a partir del descubrimiento del sistema inmune de organismos procariontes.

En 1987 ya se observó que algunas bacterias, en concreto *Streptococcus pyogenes*, eran capaces de defenderse de los virus que las atacaban destruyendo su material genético. Pero no fue hasta 1993 cuando Francisco Juan Martínez Mojica descubrió secuencias palindrómicas regularmente espaciadas en el genoma de arqueas, clave para el desarrollo de Crispr y motivo por el cual estas técnicas de edición genética se llaman así. Juan Mojica,

microbiólogo de la Universidad de Alicante, estaba investigando en aquel entonces los mecanismos moleculares por los cuales los microorganismos que habitan en las salinas de Santa Pola se adaptaban tan bien a los cambios de salinidad. Al secuenciar ADN de arqueas vio cuatro letras que se repetían en su genoma y como entre las zonas repetidas había una secuencia diferente en cada una. Comparándolo en las bases de datos descubrió que un fragmento de material genético de virus bacteriófagos encajaba con el fragmento de las secuencias que se encontraban en medio de las repeticiones y que aquellos organismos que presentaban un fragmento del genoma del fago no eran infectados por el virus (Montoliu y Martínez Mojica, 2021).

Esto se debe a que cuando un virus infecta una bacteria o como era en este caso una arquea, inserta en su interior su material genético que servirá para replicar copias del virus y posteriormente expulsarlas al exterior para incorporarlo a muchas más células. Cuando las bacterias sobreviven al ataque del virus los incorporan a su genoma el cual producirá constantemente copias de este ADN vírico en ARN que permanecerá libre en el interior del microorganismo y se solapará al ADN del virus cuando este vuelva a introducirse en el organismo (Fig.2). Una vez formado el complejo ARN-fragmento de ADN vírico, entra en juego una proteína Cas, esta proteína es una nucleasa producida por unos genes asociados a Crispr llamados genes Cas. La proteína fue descubierta en 2005 por el equipo de investigación de Alexander Bolotin y se encarga de procesar la molécula del virus apareado y destruir el ADN del virus (Montoliu y Martínez Mojica, 2021).

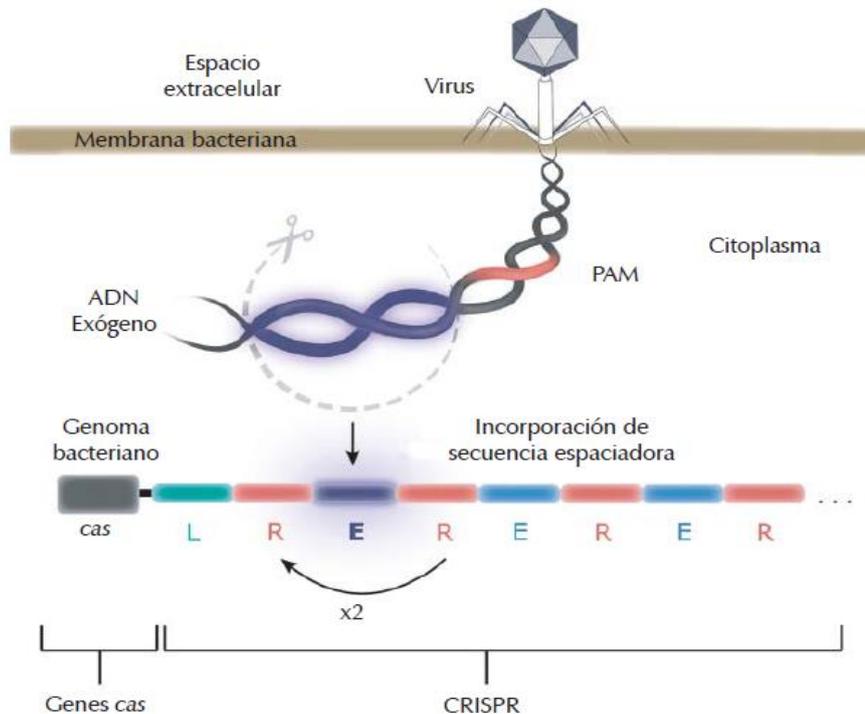


Figura 2. Representación de la incorporación de la secuencia espaciadora en el genoma de una bacteria.

Fuente: Artículo de "La revolución en ingeniería genética sistema Cris (Lammoglia_Cobo et al-2016)

Por lo tanto, Crispr es un sistema de defensa que existe en microorganismos procariontes para defenderse de invasores como bacteriófagos, plásmidos y cualquier otro elemento que pueda introducirse ADN externo. Este sistema de defensa capturará los fragmentos invasores y los incorporará a su genoma. Tras sucesivas copias del fragmento en ARN, cuando el cuerpo extraño vuelva a entrar en el organismo el ARN se apareará con el ADN virus y será procesado y destruido por la nucleada CAS (Lammoglia_Cobo et al-2016).

En 2012 Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna de la Universidad de California propusieron un estudio para emplear este sistema de defensa de las bacterias como técnica de edición genética en el que pudieran controlar qué fragmento de ADN es cortado mediante Crispr y por el cual ganaron el premio nobel de química en 2020 (Ortonobes, 2022).

1.2.2 Empleo de las herramientas Crispr

Los elementos fundamentales para llevar a cabo la técnica Crispr/Cas que permitirá editar cualquier gen de un organismo son; por un lado, la proteína CAS 9 (endonucleasa asociada a Crispr) que cortará el ADN y por otro una guía de ARN (gRNA o sgRNA). Esta guía es un corto fragmento de ARN sintético que será la encargada de indicar a la proteína por donde

debe cortar. Según su edición permitirá trabajar con unos genes u otros ya que al cambiar su secuencia también se verá modificada la diana genómica (Fig.3) (Montoliu, 2022).

Primeramente, necesitaremos saber la secuencia exacta del gen que vamos a editar para así diseñar el fragmento de ARN guía que será complementario a la secuencia que queremos modificar. El ARN guía se compondrá de una secuencia necesaria para su unión con la proteína Cas 9 y de un espaciador que contiene alrededor de 20 nucleótidos establecidos por el intervencionista según lo que se pretenda modificar y que definirá como **diana genómica**. Hay que tener cuidado a la hora de seleccionar los nucleótidos, deben cumplir dos condiciones, que la secuencia sea única en comparación con el resto del genoma y que tenga inmediatamente un motivo adyacente del protoespaciador (PAM) que indica donde se unirá la proteína Cas 9. Existen programas informáticos que permiten el diseño de construcciones Crispr/Cas para la edición génica como “Breaking-cas” (Breaking-Cas: ARNg libres fuera de los objetivos para la tecnología CRISPR/Cas, 2022) y (Addgene: Guía CRISPR, 2022)

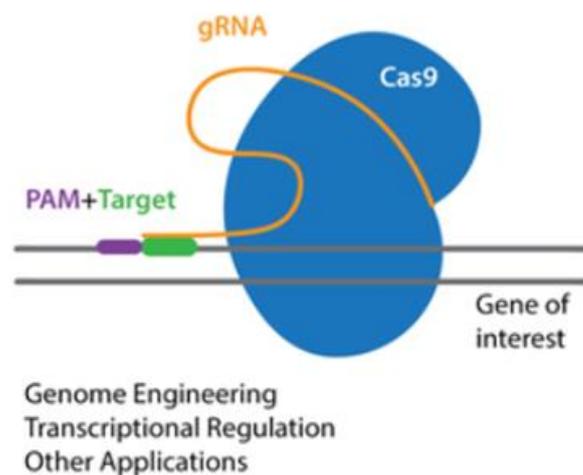


Figura 3. Componentes principales para diseñar sistema CRISPR. Fuente: Addgene: (Guía CRISPR, 2022)

-Formación de células knockout

Recibe el nombre de knockout aquellas células u organismos modificados genéticamente, su desarrollo mediante la técnica CRISPR es el siguiente;

Una vez que la proteína Cas9 ha hecho el corte en la sección de ADN que le ha indicado el ARN guía, la célula tratará de “repararlo” de dos formas posibles las cuales generalmente, causarán mutaciones. Una de las formas en las que puede corregir el corte es permitiendo que uno de los fragmentos añada o quite bases de la hebra al azar, de esta forma lo convertirá en una molécula de ADN totalmente intacta pero ligeramente distinta a la original. Por lo que

ya de por sí, sin programar nada en el laboratorio, con este corte generado por Crispr encontraremos una mutación ya sea por inserción o por delección. Otra forma que tiene la célula de recuperarse del corte producido por la proteína Cas9 es empleando una molécula de ADN de una sola cadena que actuará como molde, esto nos permitirá incorporar los cambios deseados en el gen y dirigir la edición del ADN, esta edición puede darse por sustitución, cambiamos una base por otra, por inserción, cuando el molde tiene una letra más, o delección, cuando desaparece una base (Fig.3). Esta forma de corrección es muy importante porque permite editar de forma específica prácticamente cualquier organismo ya que podemos activar o inhibir genes diana y manipular de forma muy selectiva ADN y ARN, lo que deriva en un debate ético en cuanto a su uso (Montoliu, 2022).

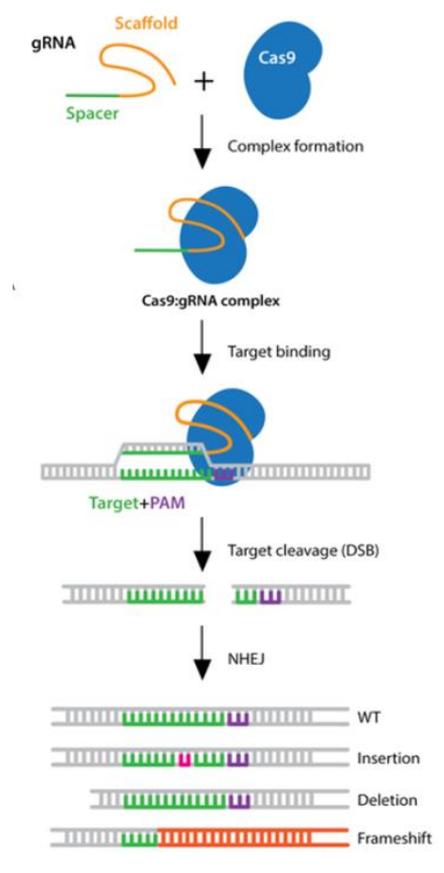


Figura 4. Generación de un Knockout usando CRISPR Fuente: Addgene: Guía (CRISPR, 2022)

Con esta técnica inicialmente lo que se pretendía era eliminar o silenciar genes diana que codifican proteínas en cualquier célula de un organismo, sin embargo, Crispr se ha convertido en una de las herramientas de edición genética más escalables siendo capaz de crear pequeñas mutaciones en los genes cortando y pegando regiones de ADN y ARN (Fig.5), revelar imágenes de ADN en células que se encuentren vivas, regular la actividad de genes

y su monitoreo, analizar rutas metabólicas, corrección de fenotipado y terapias biotecnológicas, con todo lo que esto supone para la investigación tanto en medicina como en biología. (Breaking-Cas: ARNg libres fuera de los objetivos para la tecnología CRISPR/Cas, 2022)

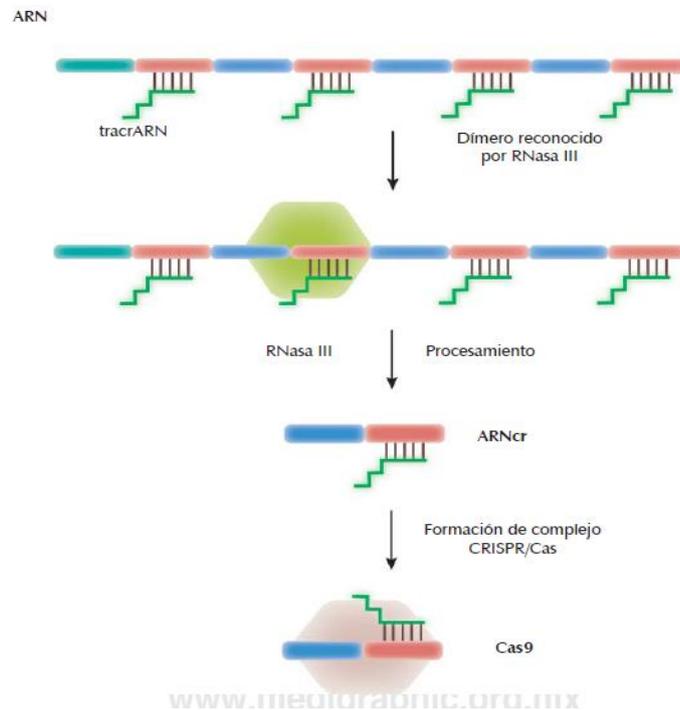


Figura 5. Formación del complejo CRISPR/Cas. Fuente: Addgene: Guía (CRISPR, 2022)

Gracias a la herramienta de edición genética CRISPR se ha podido avanzar y concluir muchos experimentos que llevaban años estancados. Las alteraciones del genoma realizadas para activar o desactivar un determinado gen ha hecho posible investigar las funciones que desempeñan muchos de ellos en el organismo, así como las mutaciones que pueden dar lugar a una enfermedad (Montoliu, 2022).

Sin embargo, a pesar de las ventajosas características que podemos encontrar en la técnica CRISPR, hay que tener en cuenta la alta tasa de mutaciones espontáneas y translocaciones cromosómicas no deseadas que puede generar. Estos procesos suponen un problema ya que pueden distorsionar los resultados en un estudio. Para evitar que ocurran se recurre al uso de Cas 9 nickase (una proteína complementaria), o al empleo un software especializado en modelos de probabilidad para relizar una selección del ARN guía más preciso para su correspondiente ADN (Lammoglia-Cobo et al., 2016).

Finalmente cabe recalcar que CRISPR supuso un avance en la edición genética otorgando una forma más sencilla, cómoda y versátil de trabajar y que abrirá las puertas para el desarrollo de nuevas técnicas más avanzadas. Pero esto no significa que antes de este hallazgo no existieran herramientas para la modificación de genes, consiguiendo, aunque fuera de otra forma, los mismos resultados que se obtendrían con CRISPR.

1.3 Infección de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*

1.3.1 *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación genética es un proceso genera “Organismos genéticamente modificados (OGM)” con el principal objetivo de mejorar sus genotipos y expresar así cualidades agronómicas de interés y de mercado en el caso de los cultivos vegetales y estudiar diversas funciones biológicas en el caso de animales. Para ello se introducirá dentro del material genético de una célula, ADN exógeno de su genoma (Valderrama, 2005).

La incorporación de ADN foráneo en una planta se puede realizar a través de diferentes vectores que determinan la técnica de trabajo (Valderrama, 2005).

En este trabajo nos centraremos en la transferencia horizontal de bacterias a plantas, se trata de un método indirecto de transformación cuyo vector biológico más empleado es *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens es una proteobacteria alfa que pertenece a la familia Rhizobiaceae, empezó a tomar fuerza en el campo de la ingeniería genética de plantas cuando en 1977 un grupo de científicos, descubrieron fragmentos de ADN procedentes de *A.tumefaciens* en un trozo de agalla de una planta de tabaco. Gracias a esto se pudo investigar acerca de la capacidad que tenía *Agrobacterium* de transferir ADN entre diferentes reinos consiguiendo así importantes avances para la ciencia como el estudio de la expresión y función de determinados genes (genética inversa), transformar plantas susceptibles que presentasen genes importantes agronómicamente o incluso poder producir plantas con características nuevas (Valderrama, 2005).

-Proceso de infección de *Agrobacterium tumefaciens*

Cuando un vegetal sufre un corte, se liberan una serie de compuestos químicos fenólicos (como la acetosiringona) cuyo olor atraerá a *Agrobacterium tumefaciens* y convertirá la herida en un foco de entrada para la infección, este fenómeno se conoce como quimiotaxis. Una vez que la bacteria se encuentra dentro de la planta introducirá parte de su genoma en el

hospedor, esta información transferida recibe el nombre de ADN de transferencia y es en él donde se encuentra el plásmido Ti (Tumor inducing) (Fig.6). El plásmido Ti desempeña un papel fundamental para la incorporación de ADN foráneo ya que es el responsable de la formación de tumores y contiene los genes *vir*, involucrados en la incorporación del fragmento del material genético del ADN en el genoma de la planta (Valderrama, 2005).

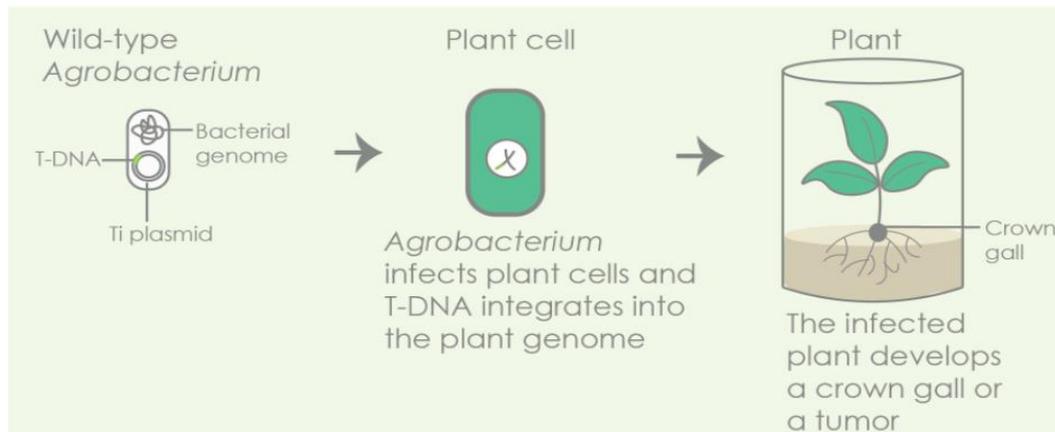


Figura 6. Esquema de la infección de *Agrobacterium* a células vegetales. (Fuente: Goldbio, 2022)

Sin embargo, conseguir introducir el gen con el que se pretende investigar en un plásmido Ti, puede ser un proceso realmente laborioso debido a que, a pesar del gran tamaño que presentan, estos plásmidos contienen un bajo número de copias, son complicados de aislar, tienen pocos lugares de clonación.

Función en la transformación de los vectores binarios:

El vector T-binario es un vector de menor tamaño que los plásmidos-Ti debido a que no contiene genes *vir* ni ninguna secuencia génica responsable de la formación de tumores (Fig.7). En su caso, se encuentran compuestos por una serie de repeticiones de ADN-T de los plásmidos Ti y del gen que se desea introducir en el genoma de la planta junto con algún sistema de selección en la planta.

El plásmido auxiliar *vir* contiene genes *vir* que son los encargados de codificar la proteína Vir. Esta proteína desempeña un papel fundamental en la transformación con *Agrobacterium* ya que facilita el corte y transferencia del ADN-T de la bacteria hasta las células de la planta (Una guía para los vectores binarios de ADN-T en la transformación de plantas | GoldBio, 2022).

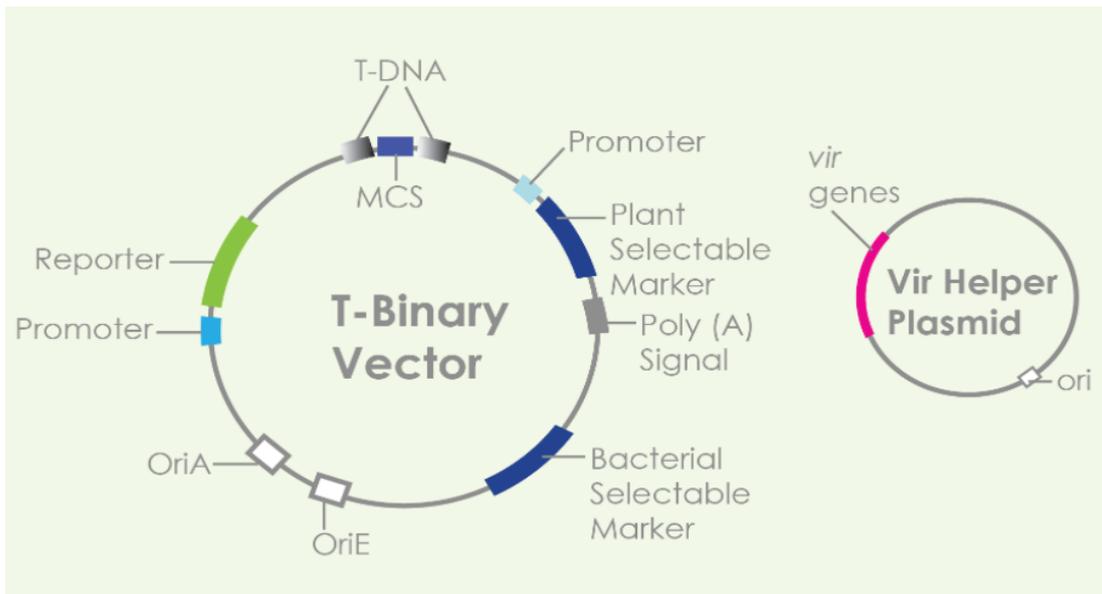


Figura 7. Esquema de la composición de un vector Binario y el plásmido de ayuda. (Fuente: goldbio, 2022)

Proceso a seguir para la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*

1º Construcción del ADN recombinante e introducirlo en *A.tumefaciens*: Requiere insertar el transgen (ADN exógeno, en este caso el gen Cas9 y el ARNg), en un plásmido binario en la zona que corresponde al T-ADN entre el, LB (left border) y RB (right border).

Una vez hecho obtenemos el plásmido recombinante el cual se introducirá dentro de la bacteria (*Agrobacterium*), por ejemplo, a través del proceso de electroporación. La electroporación, también conocida como electroporación es una técnica que consiste en introducir el ADN plasmídico en el interior de una bacteria mediante ondas electromagnéticas que causarán un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plásmica de la célula. La bacteria transformada con el plásmido recombinante que contiene el ADN exógeno de interés será cultivada en un medio de cultivo para *Agrobacterium*.

2º Infección de las células vegetales a transformar con el *Agrobacterium* transformado: Para ello se ponen en contacto los explantes, que suelen ser porciones de hojas, con la bacteria para que infecte las células e inserte el t-ADN del plásmido dentro del núcleo de las células haciendo que porten el transgen y acaben insertándolo en el genoma de la planta produciendo células transgénicas.

3º Seleccionar las células transformadas en un medio selectivo: En este paso lo que se pretende es detectar qué plantas han conseguido ser transformadas y cuáles no, para ello se procede a la colocación de explantes en un medio selectivo: Junto al transgen se suele

insertar un gen de selección, que actuará como un gen de resistencia a un antibiótico, normalmente kanamicina, para que aquellas células que se han transformado puedan sobrevivir en el medio selectivo y aquellas que no, se secarán y acabarán muriendo.

4° Regenerar plantas a partir del explante: Además de las pocas limitaciones de transferencia de genes entre los diferentes reinos animales que ofrece el trabajar con *Agrobacterium*, también es un vector muy cómodo puesto que no requiere el empleo de equipos sofisticados, por lo que las transformaciones se pueden conseguir mediante protocolos simples, se puede emplear en diferentes tipos de tejidos vegetales y ofrece una baja probabilidad de re-arreglos. Sin embargo, implica ejercer daño físico en el tejido que se desea infectar (Horsch, 1985).

1.3.2 Breve resumen del protocolo general de transformación con *Agrobacterium*

-Infectar explantes con una dilución de un cultivo de *Agrobacterium* en medio de cultivo durante 15 min.

-Incubación de los explantes en medio de cultivo no-selectivo (placas co-cultivo) en oscuridad durante 3 días.

-Opcionalmente: Lavado de explantes con cefotaxima para desactivar restos de *Agrobacterium* que continúen en las placas y así reducir el riesgo de infecciones e incorporación de los explantes a un medio selectivo.

-Comprobar que la planta finalmente desarrollada es transgénica (desarrollo con kanamicina y pruebas de PCR).

Controles empleados para asegurarnos la efectividad de la transformación:

a) Control del cultivo de *Agrobacterium* transformado:

Para certificar que estamos trabajando con *Agrobacterium* transformado con el plásmido recombinante emplearemos placas de cultivo y medio líquido de YEB suplementado con kanamicina puesto que el gen de resistencia a la kanamicina se encuentra en el plásmido y si no se hubiese implantado correctamente los Agros no podrían desarrollarse.

b) Control del medio de cultivo donde crecerán los explantes:

El siguiente filtro para comprobar la presencia del ADN plasmídico es la incorporación de kanamicina en las placas tanto de co-cultivación como de las placas selectivas. El

objetivo es que responda de la misma forma que el control de *Agrobacterium* transgénico, esta vez seleccionando las células vegetales transformadas.

c) Control de transformación sin infectar los explantes:

Para saber si estamos siguiendo un correcto procedimiento se realizará el mismo crecimiento vegetal en plantas, pero sin transformar con *Agrobacterium* y sin el marcador selectivo, kanamicina. Si vemos que no se desarrollan explantes sin haber realizado la transformación significa que estamos cometiendo algún error en la preparación del experimento y trabajamos bajo condiciones muy agresivas para que puedan crecer y por lo tanto habrá que modificar las condiciones del experimento.

d) Comprobar si la planta regenerada a partir de explantes es transgénica

Verificar que el gen se encuentra insertado (en nuestro caso serán el ARN guía para el gen *GIGANTEA* y el gen que codifica para la proteína CAS9): Para ello se empleó una PCR convencional a partir de ADN genómico, usando cebadores diseñados para la amplificación de los genes de interés.

Verificar que el gen CAS9 se expresa (última comprobación para asegurar el éxito de la mutación con el gen de interés, en este caso *GIGANTEA*): RT-PCR (reverse-transcriptase-PCR) con PCR cuantitativa.

e) Amplificación del gen mutagenizado, clonación y secuenciación para identificar el punto de mutación (Leiva Brondo, 2022).

1.3.3 Relevancia del gen *GIGANTEA*

El siguiente estudio acerca de la optimización de protocolos de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* se aplicó una construcción que contenía una guía para el gen *GIGANTEA*.

GIGANTEA (GI) es un gen que se descubrió por primera vez en *Arabidopsis thaliana*, su especificidad se centra únicamente en organismos vegetales ya que solo se ha ubicado en el genoma de las plantas. Normalmente aparece como una sola copia en la mayoría de especies vegetales, sin embargo en la familia de las Solanáceas se han observado dos o tres copias del gen como es en el caso de *Petunia hybrida*, o *Nicotiana benthamiana*, probablemente debido a una desviación evolutiva en dichas familias (Brandoli et al., 2020).

La relevancia de *GIGANTEA* en la Agronomía se basa en la cantidad de funciones biológicas que es capaz de regular en las plantas. Aquellas funciones en las que se ha podido detectar su influencia son; regulación del ritmo circadiano, tolerancia al calor, influencia de las señales luminosas, marcador hormonal y en el fotoperíodo de las flores. Sin embargo, el papel por el que se muestra más interés en su estudio es por la capacidad de controlar el tiempo de floración. Respecto a este proceso, *GIGANTEA* involucra la base de la interacción con miRNA y muchas rutas independientes o no del gen *CONSTANS (CO)* (Brandoli et al., 2020).

1.3.4 Métodos de control de infección en las placas

Cuando trabajamos con *Agrobacterium tumefaciens* en transformaciones genéticas, se emplea un amplio abanico de antibióticos que permite controlar diferentes parámetros en el desarrollo de los organismos modificados. Dichos antibióticos ayudan a asegurar la correcta implementación de un gen que no se puede desarrollar en ciertas condiciones, promulgar el desarrollo de tejidos a estudiar, restringir que el único organismo patógeno de infección es la bacteria con la que se pretende trabajar o la completa eliminación de la bacteria una vez realizada su función (Estopà et al., 2001).

La importancia de eliminar *Agrobacterium tumefaciens* cuando ya no se requiere su presencia y la forma en la que se realiza influirá en la supervivencia de la planta puesto que los contaminantes microbianos que presentan los tejidos cultivados reducen la tasa de multiplicación, el enraizamiento y pueden llegar a causar la muerte del organismo (Estopà et al., 2001).

Aquellos antibióticos más exitosos para destruir *Agrobacterium tumefaciens* son cefotaxima, carbenicilina y ticarcilina. Estos antibióticos pertenecen al grupo de los B-lactámicos y se caracterizan por inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, causando finalmente la muerte de la bacteria al alterar la pared. De entre todos, cefotaxima suele ser el más efectivo puesto que es un compuesto fuertemente resistente a las betalactamasas que libera *Agrobacterium*. Sin embargo, cada antibiótico genera diferentes efectos en el desarrollo de los explantes y presenta distintas cualidades según la especie sobre la que actúa, es por eso por lo que están siendo durante varios años objeto de estudio en diferentes plantas (Estopà et al., 2001).

La eficacia de los B-lactámicos, como la de otros antibióticos, se mide según los valores de la Concentración Inhibidora mínima (MIC), niveles que alcanzan mayor estabilidad bajo condiciones de pH entre 4,5-6,5 a 25°C de temperatura. No obstante, no siempre muestran una influencia fulminante en la eliminación de bacterias pudiendo resurgir y continuar su

desarrollo una vez aplicados los compuestos determinados en el ensayo. En numerosos estudios se ha observado la recuperación y crecimiento de bacterias hasta alcanzar densidades significativas al cabo de un tiempo. Esta restitución de las bacterias puede deberse a la pérdida de efectividad del antibiótico debido a su degradación o bien al desarrollo de resistencia por parte de la bacteria (Brouwers et al., 2020).

El empleo de antibióticos como medida de control resulta muy efectiva pero el hecho de que también genere efectos negativos en el desarrollo del vegetal sobre el que se aplica lleva a plantearnos hasta qué punto son realmente necesarios. Además de suprimir *Agrobacterium tumefaciens*, los principales efectos que los antibióticos generan en el desarrollo de explantes transformados son los siguientes; carbenicilina, aumenta el crecimiento de los callos, es el menos tóxico de los tres y según su concentración estimula el desarrollo de brotes adventicios en hojas de manzano y *Antirrhinum majus*. Ticarcilina presenta la capacidad de eliminar *Agrobacterium* sin influir en la regeneración del organismo y, por último, cefotaxima que induce la maduración somática y presenta un efecto estimulante en el desarrollo, además es el más efectivo a la hora de eliminar *Agrobacterium tumefaciens* puesto que es un compuesto fuertemente resistente a las betalactamasas (que libera *Agrobacterium*) (Estopà et al., 2001).

El antibiótico mediante el cual buscamos optimizar el protocolo de transformación para inoculaciones futuras en plantas transgénicas es la cefotaxima (Fig.8). Son muchos los estudios realizados acerca de este compuesto tanto a nivel de plantas como en humanos. Por ello resulta fundamental conocer el comportamiento que mostraron diferentes vegetales ante la aplicación de cefotaxima en su desarrollo ya sea transgénicas o no. Resultados procedentes de otros estudios:

Como característica común reflejada en escritos sobre antibióticos antibacterianos, la cefotaxima destaca por su efecto estimulante en el crecimiento, inducción de la maduración somática, morfogénesis y mejora de la tasa de regeneración. Sin embargo, hay otros antibióticos más estimulantes del desarrollo y regeneración de algunos órganos o efectivos para la eliminación de *Agrobacterium* (Estopà et al., 2001).

Para saber la reacción que generaba la cefotaxima en cultivos *in vitro* se registró la evolución de distintos explantes de clavel inoculados con *Agrobacterium* sometidos a este antibiótico. El explante favoreció su regeneración y crecimiento con la presencia de cefotaxima. Uno de los factores que más condiciona la regeneración de brotes y eliminación total de *Agrobacterium* es la concentración de cefotaxima y su combinación con otros antibióticos. Unas concentraciones excesivas de cefotaxima no suelen dar buenos resultados y llegan a inhibir y alterar la regeneración de las plántulas. De esta forma, concentraciones bajas de

cefotaxima aumentarán el potencial de regeneración y aportarán una mayor eliminación de *Agrobacterium* (Samara et al., 2018).

Por otro lado, mientras que en algunos registros se mencionó el potencial tóxico de la cefotaxima, así como la disminución del crecimiento de raíces, terminaciones de los primordios radiculares y en el desarrollo foliar y de brotes, en otros se halaga la eficiencia del compuesto sobre su capacidad regenerativa en explantes transformados, favoreciendo la elongación de hojas, enraizamiento y regeneración. Además, combinando la concentración de cefotaxima junto con la de otros antibióticos, conseguimos potenciar el desarrollo de distintas partes de una estructura vegetal, por ello según la concentración de cefotaxima junto con IAA conseguiremos favorecer el desarrollo radicular solo o inducir además la formación de raíces y hojas secundarias a niveles significativamente más altos (Naderi et al., 2016).

Debido al contraste de información que aparece en diferentes artículos acerca de los efectos que genera la cefotaxima en un explante transformado, vuelve de especial importancia el desarrollo de proyectos que estudien el efecto que causará este antibiótico en tejidos vegetales según su concentración y combinación con otros antibióticos y así poder optimizar protocolos de transformación de distintas especies para obtener resultados más favorables. Una planta que ha servido como modelo en numerosas investigaciones científicas a lo largo del tiempo ha sido *Petunia hybrida*, su popularidad surgió a raíz del descubrimiento del RNAi y dispone de gran cantidad de información acerca de sus técnicas de transformación génica y comportamiento que muestra debido a lo bien que responde su manejo en condiciones de laboratorio. Esto hace que sea buen material de estudio para conocer la respuesta de la cefotaxima en futuras transformaciones (Naderi et al., 2016).

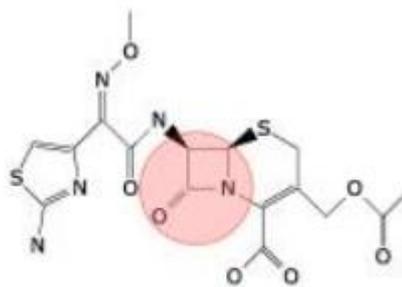


Figura 8. Estructura de Cefotaxima. Fuente. (Brouwers et al., 2020)

1.4 Regeneración de tejidos transformados

1.4.1 Producción de callos *in vitro* y genes analizados

Un cultivo "*in vitro*", es aquel que se desarrolla en un medio nutritivo bajo condiciones estériles pudiendo tratarse de plantas, semillas, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores (Pierik, 1987).

Poder producir organismos vegetales en un cultivo *in vitro* es posible gracias a que las células de las plantas son totipotentes y omnipotentes lo que les permite continuar con su crecimiento a partir de células aisladas hasta formar un nuevo individuo completo. De esta forma, creando un ambiente que reúna las características necesarias para su desarrollo podremos generar material a partir de una sola célula que reúna unas condiciones sanitarias mejores que las generadas de forma convencional. Aquel órgano o tejido vegetal que se cultiva *in vitro*, recibe el nombre de explante. Sin embargo, reunir todas las condiciones idóneas que requiere una planta para su desarrollo, así como mantener el medio libre de virus e infecciones llega a ser muy complejo, por lo que requiere de un control muy específico del medio de cultivo y de las necesidades que llegará a tener el explante a lo largo de su desarrollo (LA BIOTECNIA, 1994).

Los cultivos *in vitro* son muy importantes en el mundo de la investigación puesto que nos permiten; conservar material vegetal, obtener plantas transgénicas, desarrollo por micropropagación y cultivo de meristemos para generar plantas libres de virus y enfermedades rápidamente, además facilita la producción de compuestos de interés comercial y variación somaclonal. Por otro lado, estos cultivos son de gran ayuda en la aceleración de procesos genéticos facilitando el desarrollo de muchos estudios a nivel celular y molecular en las plantas bajo condiciones de laboratorio, lo que ha convertido los cultivos *in vitro* en un área de gran apoyo para avances en la biotecnología moderna (Castillo, 2004).

Algunas técnicas de cultivo generadas con el objetivo de acelerar procesos genéticos son;

-Cultivo de embriones inmaduros, somáticos y cigóticos, producir plantas haploides, a través de cultivos *in vitro* de gametofitos, generar híbridos somáticos mediante protoplastos, selección *in vitro*, regeneración *in vitro*.

Las finalidades que se le dan a los cultivos *in vitro* son muy diversas, desde su uso en industrias farmacéuticas y alimentarias hasta el empleo en el campo de la investigación. Sin embargo, siempre y cuando su aplicación se destine a la agricultura y acabe en el campo, el sistema *in vitro* deberá de lograr como producto final la regeneración completa de una planta. La correcta regeneración es muy importante en los trabajos acerca de ingeniería genética,

aquellos explantes transformados que no consigan alcanzar una regeneración completa no tendrá ninguna utilidad de aplicación directa (Mroginski & Roca, 1991).

La evolución del explante en un medio de cultivo puede darse de dos formas, por un lado, el desarrollo morfológico (organogénesis) del explante, formando primero los meristemos, después primordios, posteriormente generará brotes y finalmente producirá raíces adventicias. Por otro lado, podemos encontrar, la formación de embriones somáticos a partir de la masa de células que se encuentran en el explante (embriogénesis). Ambas formas son válidas para alcanzar la multiplicación clonal (LA BIOTECNIA, 1994).

A la hora de decidir el explante empleado para su cultivo *in vitro* es importante tener establecido el objetivo de cultivación y la especie vegetal con la que se trabajará (Fig.9). Cuando la intención es generar callos se podrá emplear cualquier explante que dispongan de células nucleadas vivas, lo más común es utilizar como material de partida órganos, explantes de hoja o raíz, tejidos, células y protoplastos de plantas jóvenes crecidas en invernaderos o trabajar con semillas de plantas en condiciones asépticas. Por otro lado, la determinación del explante empleado también se verá afectada por otros factores como; homogeneidad, disponibilidad, facilidad para manipularlo, rango de contaminación y rapidez de crecimiento en cultivos *in vitro*. Otro parámetro que afectará al éxito del desarrollo *in vitro* es la interacción cuantitativa de aquellos reguladores de crecimiento (fitohormonas) que se encuentren involucrados en el desarrollo de las células. Algunas variedades vegetales muestran un alto grado de sensibilidad respecto al explante empleado para poder formar callo variando según la familia a la que pertenezca. Sin embargo, se conoce que una de las especies más versátiles y que genera callos con mayor facilidad es *Nicotiana tabacum* (Mroginski & Roca, 1991).

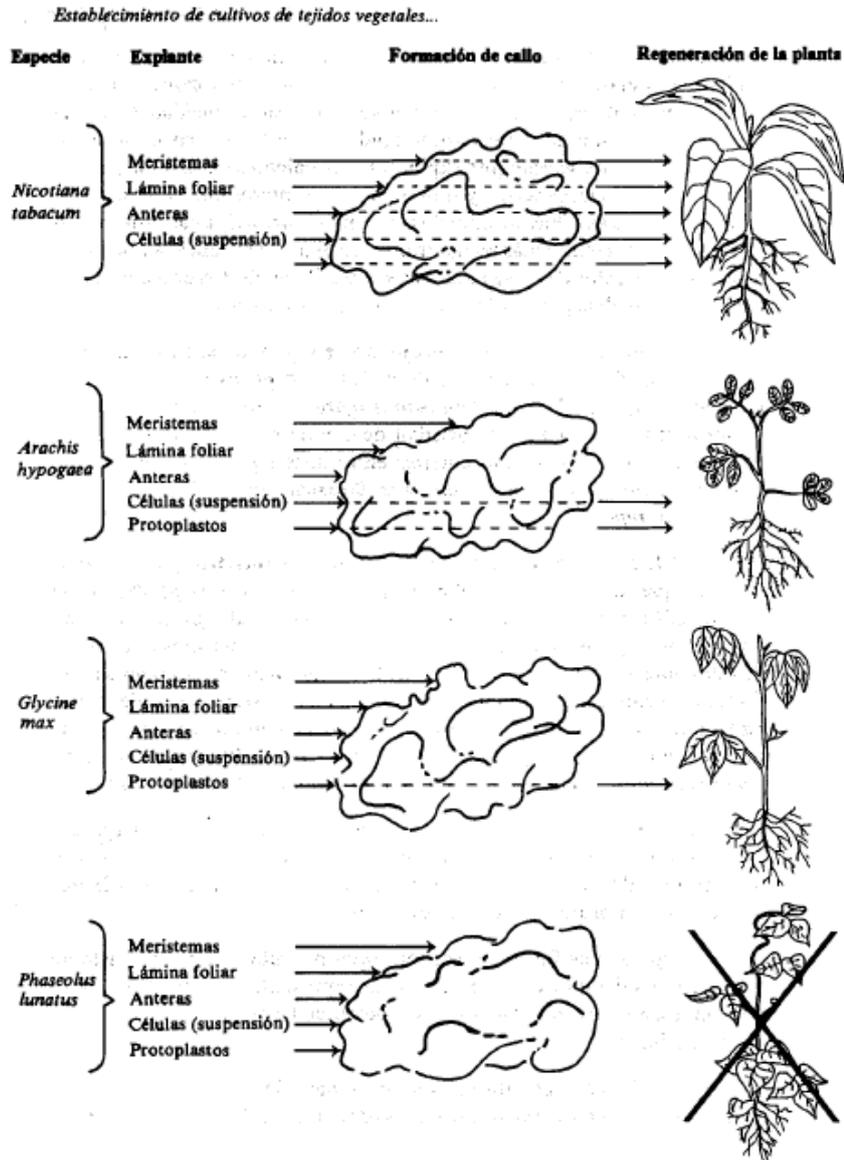


Figura 9. Inducción de callos y regeneración de plantas en cultivo *in vitro* de distintos explantes en cuatro especies de dicotiledóneas herbáceas. Fuente: (Mroginski y Roca, 1991)

1.4.2 Análisis de genes

Cuando las células de una planta se exponen a hormonas, en respuesta, ciertos genes cambiarán su nivel de expresión. Esto puede conducir a un aumento de los niveles de ARNm de estos genes o, en caso de regulación a la baja, a una disminución en la producción de ARNm. En el caso de *Camellia sinensis*, una especie utilizada para la producción de té, se encontraron 3014 genes expresados diferencialmente al inducir un callo a partir de un explante de tallo y 3495 al inducir callos a partir de una hoja. La mayoría de los genes estaban regulados a la baja (70%) (Gao *et al.*, 2019). Para encontrar genes que están regulados hacia arriba o hacia abajo mientras se someten a la inducción de callos en *Antirrhinum majus*, los

genes de otras plantas como *Camellia sinus* y plantas modelo como *Zea mays* o *Arabidopsis thaliana* (Xu *et al.*, 2012)(Du *et al.*, 2019) se comparan con los genes y proteínas que se encuentran en el genoma de *Antirrhinum majus* utilizando bancos de datos como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y el “Antirrhinum genome database (<http://bioinfo.sibs.ac.cn/Am/>) (trabajo previo por miembros del laboratorio de Genética Molecular, IBV; UPCT

Función de genes analizados a partir de callos de *Antirrhinum* de diferentes variedades: *Antirrhinum Royal Bride*, *Antirrhinum Lucky Lips*, *Antirrhinum Rembrandt*.

a) *CRF 3 (Factor de Respuesta a Citoquinina)*

CRF 3 es uno de los doce genes que conforman la familia de genes de factor de respuesta a citoquinina (CRF) en *Arabidopsis thaliana*. Pertenece a una de las vías genéticas que intervienen en la regulación del desarrollo de raíces laterales en las plantas como respuesta ante diversos factores ambientales (ej; humedad, frío e incluso los niveles de nutrientes y sal). *CRF 3* interviene en el inicio y formación de las raíces secundarias. Su expresión génica, al igual que en *CRF 2*, se encuentra regulada por el frío, una sobreexpresión de este gen adelantará el inicio y aumentará la formación de raíces laterales y mutaciones en el retrasaran dicho desarrollo (Jeon, J. *et al.*,2016).

b) *INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)*

Los genes *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA)* son los responsables de la respuesta de la fitohormona auxina implicada en la estimulación del crecimiento. Esto se debe a que dichos genes codifican represores transcripcionales de corta duración objetivo de las proteínas TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE/AUXIN RECEPTOR F-BOX. La expresión génica que producen las auxinas cuando interactúan o se encuentran en contacto con miembros de las proteínas que pertenecen al factor de respuesta de auxina es regulada por las proteínas AUX/IAA sin embargo la función exacta de estas proteínas no se conoce muy bien (Groß-Hardt *et al.*, 2002).

Las auxinas son unas sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, cuya biosíntesis puede ocurrir a partir de diferentes vías, una de ellas es *INDOL-3-ACÉTICO* o *ACETAMINA*. Gracias al descubrimiento de la implicación de esta hormona en el control del crecimiento se pudo demostrar que los tumores generados por *Agrobacterium tumefaciens* están inducidos por IAA producidos a partir de genes introducidos, por lo que podrán crecer en ausencia de reguladores de crecimiento

(Duca et al., 2014).

c) *AINTEGUMENTA-LIKE 5 (AL5)*

AINTEGUMENTA -LIKE 5 es uno de los 18 genes que conforman el subgrupo AP2 perteneciente a la familia de proteínas de factores de transcripción AP2/ERF característica por su papel regulador en diferentes puntos del desarrollo de las plantas. Pertenecen a un grupo de genes que reciben el nombre de “*AINTEGUMENTA-LIKE*” por la similitud de su secuencia con la del gen *AINTEGUMENTA (ANT)*. Su expresión viene dada por patrones temporales y espaciales distintos en los meristemas de la flor. *AINTEGUMENTA-LIKE 5* desempeña papeles muy importantes en diferentes procesos a lo largo del desarrollo de diferentes tejidos de una planta, sin embargo, la principal característica de este gen es su influencia en el desarrollo floral. Suelen encontrarse en tejidos jóvenes que se están dividiendo continuamente y se transcriben en diferentes tejidos a lo largo de su evolución (Losa et al., 2010).

d) *CYCLIND 3;1 (CYCD3;1)*

La ciclina D es un miembro de la familia de proteínas CICLINA que participa en la regulación de la progresión del ciclo celular. La síntesis de ciclina D se inicia durante G1 e impulsa la transición de fase G1/S. *CYCD3;1* es una proteína altamente inestable, degradada por un mecanismo dependiente del proteasoma y se pierde rápidamente cuando las células entran en estados de reposo, como la fase estacionaria (Healy et al., 2001).

Podemos recurrir a un resumen de las principales funciones y características que desarrollan los genes candidatos involucrados en el desarrollo de callos de distintas variedades de *Antihirrinum majus* empleados en los experimentos de la presente investigación en la Tabla S1 de Anexo I.

1.4.3 Medición del nivel de expresión con PCR cuantitativa

El nivel de expresión de un gen se puede medir mediante la RT-PCR (reverse transcriptase – qPCR), basado en una reacción en cadena de la polimerasa que permite amplificar un segmento de ADN comprendido entre dos cebadores específicos. Para poder realizar la amplificación de un segmento de ADN es necesario lo siguiente: ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa), oligonucleótidos de alrededor 20 pares de bases de longitud situados en los extremos de la secuencia que se desea amplificar, por lo que es necesario conocer la secuencia de nucleótidos de dicho segmento para diseñar los oligonucleótidos

específicos. Además, el medio de reacción tiene que contener los 4 nucleótidos trifosfato que son adenina, guanina, citosina y timina, el ADN molde y un tampón. Normalmente este proceso se realiza en un termociclador. Para la qPCR (PCR cuantitativa), hay que añadir también un compuesto fluorescente llamado “SybrGreen”, que se intercala en el ADN de doble hebra y emite una señal fluorescente, medida por un láser. Cuantas más copias de un fragmento de ADN se encuentran en una reacción de qPCR, más fuerte va a ser la señal de fluorescencia. De esta manera, se puede cuantificar la cantidad de un determinado fragmento de ADN en una muestra. Para cuantificar el número de copias de un gen expresado, hay que primero retro-transcribir el ARN en ADN copia (cDNA) mediante la enzima transcriptasa inversa. Es importante amplificar siempre, para cada muestra, también un gen de referencia, en nuestro caso la ubiquitina ligasa. Se trata de genes de mantenimiento celular que se expresan en todos los tejidos y células a niveles equivalentes a la cantidad de cDNA en la muestra. Por lo tanto, funcionan como un valor estándar que permite comparar el nivel de expresión génica entre diferentes muestras (Kozera and Rapacz, 2013).

2.OBJETIVOS

Los objetivos generales reunidos en la presente investigación realizada en el Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) del edificio I+D+i de la Universidad Politécnica de Cartagena se basaron por un lado, en la mejora de metodologías de trabajo génicas para asegurar una exitosa transformación en diferentes variedades vegetales y conseguir así allanar el camino para el desarrollo de transgénicos en un futuro, así como en la aportación de datos que permitan conocer la función e influencia que desarrollan ciertos genes en el desarrollo de callos.

Para conseguir el cumplimiento de los objetivos descritos se desarrollaron las siguientes vías de trabajo;

- Optimizar la metodología de transformación de las plantas modelo *Petunia hybrida* y *Nicotiana benthamiana* para la edición del genoma por CRISRR/CAS, incorporándolas a través de *Agrobacterium tumefaciens*.
- Identificación de genes marcadores para el crecimiento *in vitro* de callo en variedades de *Antirrhinum majus*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal, cepas de *Agrobacterium* y plásmido binario

Para la transformación con *Agrobacterium* se empleó hojas de plantas de *Petunia hybrida* y de *Nicotiana benthamiana*, cultivadas en cultivo *in vitro*.

Para el análisis de la expresión de genes candidatos durante el desarrollo de callos en *Antirrhinum majus*, se trabajó con callos desarrollados a partir de hipocótilos cultivados en cultivo *in vitro*.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* fue EHA105. El plásmido binario pBIN, con la construcción Crispr/Cas9 de GIGANTEA (plásmido pBIN Crispr/Cas9-Gi) fue suministrada por la empresa AddGene (Fig.10) (Addgene: Guía CRISPR, 2022).

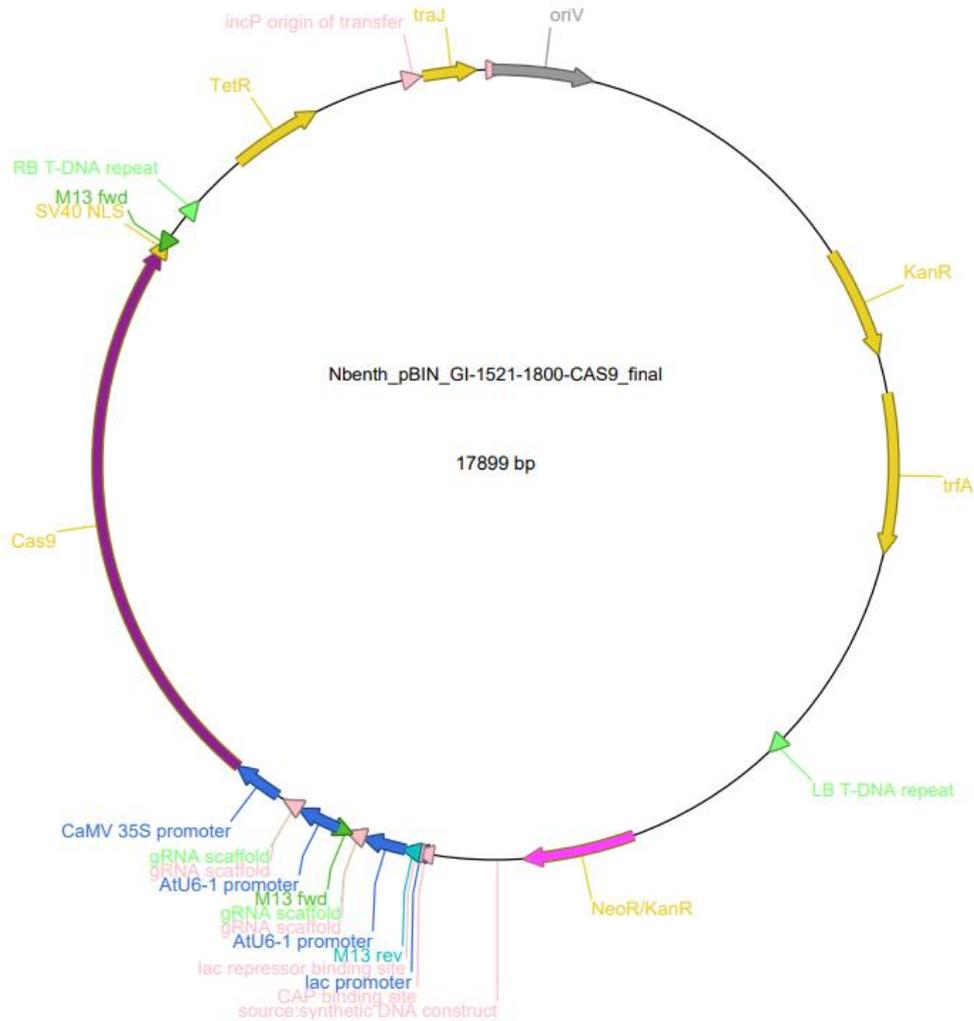


Figura 10. Plásmido de *Nicotiana benthamiana* para el gen de *GIGANTEA* Fuente: Addgene: Guía(CRISPR, 2022)

3.2 Metodología empleada para transformar plantas de *Petunia hybrida* y *Nicotiana benthamiana*

El primer paso para la transformación de *Petunia hybrida* fue la inserción del plásmido Crispr/Cas9-GI en bacterias, se empezó introduciendo en bacterias de *Escherichia coli* con el propósito/intención de comprobar la secuencia del plásmido por PCR y almacenarlo. Una vez asegurado el éxito de la inserción en *E.coli* se pasará a realizar el mismo procedimiento de transformación en *Agrobacterium tumefaciens* para la posterior infección en hojas de *Petunia* y *Nicotiana*.

3.2.1 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 con el plásmido pBIN Crispr/Cas9-GI

El ADN plasmídico fue introducido en bacterias competentes de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación a 1800 voltios, seguido por una incubación a 28°C durante 1 hora en medio de cultivo líquido "YEB", una vez centrifugado y eliminado el medio de cultivo sobrante se procedió al plaqueado en medio YEB sólido suplementado con kanamicina (Kan) (2 µl/ml de un stock de 50mg/ml) y rifampicina (Rif) (3 µl/ml de un stock de 50mg/ml), un antibiótico selectivo exclusivo para el crecimiento de *Agrobacterium*. De esta forma disponemos con kanamicina, un marcador selectivo para los *Agrobacterium* transformados y rifampicina que inhibirá el crecimiento de todas aquellas bacterias que no sean *Agrobacterium*.

Al cabo de 3 días se comenzó a observar la formación de colonias bacterias en las placas. De aquellas poblaciones de bacterias se seleccionaron 12 colonias para la comprobación de inserción del plásmido. Para ello, las bacterias se inocularon en 2,5ml YEB líquido y se incubaron en condiciones de oscuridad (debido a que *Agrobacterium* es una bacteria que se desarrolla a nivel radicular en las plantas debido a que las condiciones de oscuridad favorecen su desarrollo) durante 2 días a 28°C bajo una agitación constante de 120rpm.

3.2.1.1 Comprobación de la Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Cuando las 12 colonias seleccionadas y cultivadas crecieron lo suficiente se pudo recurrir al análisis de las muestras que permitía asegurar que el ADN plasmídico se introdujo correctamente en las bacterias. Para ello, primeramente se extrajo el ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina y posteriormente se amplifica por PCR el ARN guía y un fragmento del gen CAS9, aplicando cebadores específicos diseñados para para estas secuencias: para CAS9 - **hCas9_For** 5'-TGAGATGGCTAAGGTGGATGACTCTT-3'; **hCas9_Rev** 5'-CACTCGCAGAATATCACTCAGCAGAA -3'; para gRNA - **AtU6_For** 5' - CTTGAGAAGGAAGCGAGGGA-3'; **gRNA_Scaffold_Rev** 5' - CGACTCGGTGCCACTTTT-3'.

La extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el empleo de las siguientes soluciones;

-150 µl de Solución 1 "Buffer de lisis" y 1 µl de RNAase (50mg/ml): La solución produce una desintegración parcial de la pared celular de las células bacterianas y degrada ARN. Al añadir dicha solución las bacterias fueron resuspendidas e incubadas durante 30 minutos a 37°C.

-200 µl de Solución 2: La solución contiene 1% SDS + 0.2NaOH, provocando la lisis completa de las células bacterianas y la desnaturalización del ADN cromosomal bacteriano y del plásmido.

-150 µl de Solución 3 (conservada a 4°C): La solución tiene un pH de 4,8 y provoca la renaturalización del ADN plasmídico. Tras una centrifugación durante 10 min a 13.000 rpm se forma un precipitado que contiene restos celulares, ADN cromosomal y proteínas degradadas, mientras el sobrenadante contiene el plásmido. Se precipitó el plásmido mediante el proceso de precipitación con isopropanol.

A continuación, se realizó una PCR que nos permitirá comprobar si la construcción Crispr/Cas9-Gi se ha incorporado correctamente (Fig. 11). Una alícuota del cultivo líquido en 50% de glicerol de las bacterias transformadas se almacenará a -80°C para así poder emplearlos más adelante. La mezcla de PCR consistió en 5 µl de PCR Master mix "Kapa" (Sigma-Aldrich), 0,6 µl del cada cebador (10 mM) y 3,8 µl de H₂O: La amplificación se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 95°C durante 3 min., 35 ciclos de 95°C durante 15 sec., 60°C durante 15 sec., 72°C durante 30 sec. y una síntesis final a 72°C durante 1 min.

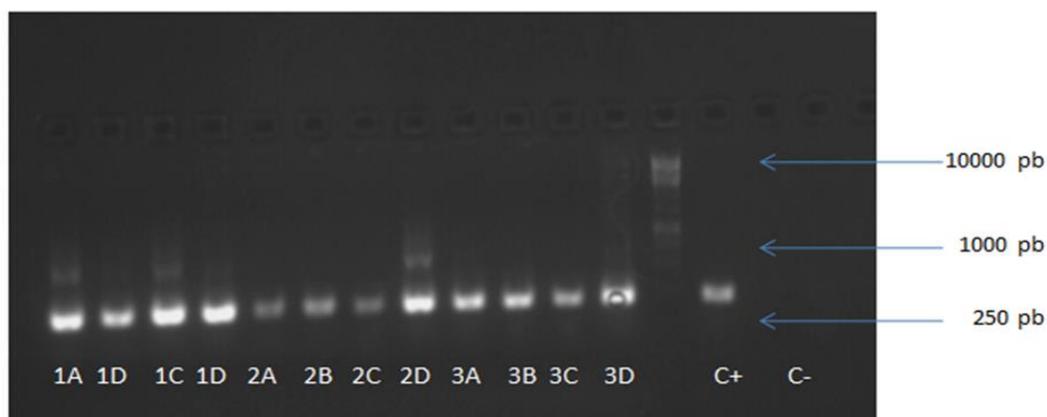


Figura 11. Amplificación del ADN correspondiente al ARN guía del plásmido pBIN Crispr/Cas9-Gi de *Petunia hybrida* con cebadores Alu6 for y Scaf rev. Extraído de *E.coli*. Control positivo: plásmido Puc119; Control negativo: H₂O.

3.2.2 Infección de hojas de *Petunia hybrida* y *Nicotiana benthamiana* con los *A.tumefaciens* recombinantes.

El siguiente experimento fundamental por el que se logró las plantas transformadas consistió en la infección de hojas de *Petunia hybrida* y *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium tumefaciens*. Para la regeneración de una planta completa transformada de *Petunia hybrida* se recurrió a la transformación a partir de hojas de plantas sembradas y cultivadas en cultivo *in vitro*. La transformación tuvo lugar mediante la metodología establecida en el protocolo “Petunia Leaf Disc Transformation” (Horsch,1985).

En cuanto al procedimiento que contempla la infección con *Agrobacterium tumefaciens* en muestras de tejidos de *Petunia* y *Nicotiana*, siempre se realizó de la misma manera, añadiendo las hormonas y antibióticos al medio de cultivo que correspondía según el estado de crecimiento del explante. Sin embargo, nuestro estudio se centró en el seguimiento del éxito de la regeneración de hojas que habían sido tratadas con cefotaxima en diferentes momentos después de la infección con *Agrobacterium* como variante del protocolo original de transformación. De esta forma se desarrollaron tres líneas de trabajo con las siguientes características.

-Experimento Modelo: Se fundamentó en el protocolo de transformación base en el que no cita el empleo de cefotaxima, solo lo aconseja como método (recomendable) para la disminución de contaminaciones. Por lo tanto, en este caso no se hizo ningún lavado con Cefotaxima después de la infección de *Agrobacterium*.

-Experimento A: Infección de las hojas con *Agrobacterium* durante 15 minutos y posterior lavado con agua y cefotaxima. El lavado se realizó justo después de retirar los Agros de las placas (Fig. 12).



Figura 12. Placas de co-cultivación después de la infección con Agrobacterium y el lavado con cefotaxima en caso del Exp A.

-Experimento B: Infección de hojas de Petunia y Nicotiana con *Agrobacterium* durante 15 minutos en placas de co-cultivación, seguido por la retirada de las bacterias y un secado con papel de filtro. Las placas fueron guardadas durante dos días en oscuridad a temperatura ambiente, seguido por el lavado con cefotaxima.

El procedimiento detallado de infección atendiendo a las diferentes aplicaciones de lavado con Cefotaxima fue el siguiente:

1º Preparación de cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* con pBIN/ Crispr/Cas9-GI para infectar las hojas: YEB líquido inoculado con precultivo de *Agrobacterium* e incubado durante 12 horas a 28°C. A continuación, el cultivo fue diluido 1:10 con agua destilada y autoclavada.

2º Elaboración del medio con sus respectivas hormonas para la preparación de placas de co-cultivación (Tabla1). Las placas de co-cultivo son el medio en el que las bacterias entran en contacto con las hojas. Estas placas están compuestas por el medio de cultivo estándar, suplementado con 6-Bencilaminopurina (BAP)– citoquinina que favorecerá el desarrollo y crecimiento de la planta y Ácido 1-naftalenacético (NAA) – auxina vegetal empleada para la propagación vegetativa. Dentro de cada una de las placas se colocarán alrededor de unos 8 trozos de hojas cortadas y se añadirá 10 ml de cultivo de *Agrobacterium* diluido.

15 minutos después de verter las bacterias en las placas de co-cultivo que contienen las hojas se retirará toda sustancia líquida de sobrante que quede en las placas y es cuando comienzan las variantes del experimento.

3° Una vez que las hojas están infectadas las placas permanecen guardadas en oscuridad a temperatura ambiente durante tres días. Pasado este tiempo, se emplea un nuevo medio de cultivo que formará las llamadas placas de selección. Para estas placas añadiremos los antibióticos carbenicilina, que limitará la presencia de bacterias Grampositivas y kanamicina del grupo de los Aminoglucósidos para seleccionar las plantas que contienen el transgen. Todas las hojas de las placas de co-cultivos se colocarán en las nuevas placas selectivas y se conservarán en cámaras de cultivo a condiciones de 12 horas luz/12 horas oscuridad a 23°C. Las placas se guardarán cubiertas por varias capas de papel que se irán retirando cada semana para acostumbrar los tejidos a la luz. Este traspaso de hojas se realizará cada 17-20 días a nuevas placas cuyo medio estará compuesto por los antibióticos pertinentes según el desarrollo del explante. Aquellas hojas que terminen formando callo en placas que contienen kanamicina demostraran que la infección ha sido un éxito. En cuanto a la composición y concentración de hormonas y antibióticos, se fue alternando y variando según la etapa de desarrollo de los explantes, debido a las distintas necesidades fisiológicas que se alcanzarán con el medio correspondiente.

Medios de cultivo aplicados en el proceso de transformación y regeneración de plantas.

Tabla 1. Medios de Cultivo para realizar las transformaciones

Medios de cultivo	Duración	Función	Composición para 1 litro
Estándar “M.S Pet”	17-21 días	Solución base del que se forman el resto de medios según las hormonas añadidas	30 g de azúcar, 4,4 gr de murashige rebasado a un pH (5,7-5,9) y 4g de Phytigel.
Co-cultivación “M.S Pet”	2-3 días	Medio donde se realiza la inoculación de Agrobacterium	Medio estándar suplementado con; 6-Bencilaminopurina (2 mg/l BAP) y Ácido 1-naftalenacético (0,1 mg/l NAA)
Selectivo “M.S. Petunia”	17-21 días	Induce el desarrollo de callos y tallos	Medio estándar suplementado con; 2 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de NAA, 500 mg/l de carbenicilina y 300 mg/l de kanamicina y 300mg/l de cefotaxima.

Enraizamiento “M.S. Petunia”	17-21 días	Favorece el desarrollo radicular para poder pasar la planta a maceta	Medio estándar suplementado con 500 mg/l de carbenicilina y 50 mg/l de kanamicina.
------------------------------	------------	--	--

Cuando finalmente hemos conseguido pasar la planta a maceta debemos de comprobar si se trata de un organismo transgénico mediante la extracción de ADN genómico de planta para la realización de PCR convencional. En la tabla S5 del Anexo se especifica el cálculo de gastos fungibles para la generación de *Petunia* transgénica con mutaciones génicas por el método CRISPR/CAS en la generación T0. Este parámetro es una información clave para el cálculo de la dimensión de gastos totales en proyectos de investigación de la genética inversa.

3.3 Evaluación de genes relacionados con el desarrollo de callos en *Antirrhinum majus*

A diferencia de los experimentos y estudios realizados con *Petunia* y *Nicotiana*, no llevamos a cabo ninguna transformación en los trabajos con *Antirrhinum majus*.

La segunda rama de investigación en la que se fundamentó el siguiente trabajo de fin de grado se basó en el estudio de la expresión de diferentes genes candidatos, posiblemente implicados en el desarrollo de callos a partir de hipocotilos en variedades de *Antirrhinum majus*.

Tabla 2. Medios de cultivo empleados para el desarrollo de callos de *Antirrhinum majus*

Medios de cultivo	Duración	Composición para 1 litro
Estándar	17-21 días	2,2 g de MS + 30 g de sucrosa
Inducción de callo	17-21 días	4,3g/L de MS, 30 g/L de sucrosa, 0,1g/L de inositol. Concentración de hormonas 0,1mg/l de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,5 mg/l de ácido naftalenacético (ANA), 1mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BA) y 9 g/L de AGAR

Primeramente, se cultivaron en placas semillas de nueve variedades distintas de *Antirrhinum majus* (Tabla 2). La germinación de las semillas y el posterior desarrollo de las plántulas tuvo lugar en un medio de cultivo estándar (medio 1). La renovación del medio fue realizada cada 17-20 días. Los hipocotilos de las diferentes variedades se pasaron a un medio de inducción de callo a los 7 días tras la germinación (medio 2). Al cabo de un mes todas las variedades habían desarrollado callo, entre todos se seleccionaron aquellos con más diferencia fenotípica significativa en cuanto al tamaño y forma, dejando como ejemplares de estudio los callos pertenecientes a las variedades (Fig.13); *Antirrhinum majus* var.Royal Bride (variedad que generó los callos más grandes), *Antirrhinum majus* var.Lucky Lips (callos pequeños), *Antirrhinum majus* var.Rembrandt (callos medianos). Establecidos los callos, se extraerá su ARN.

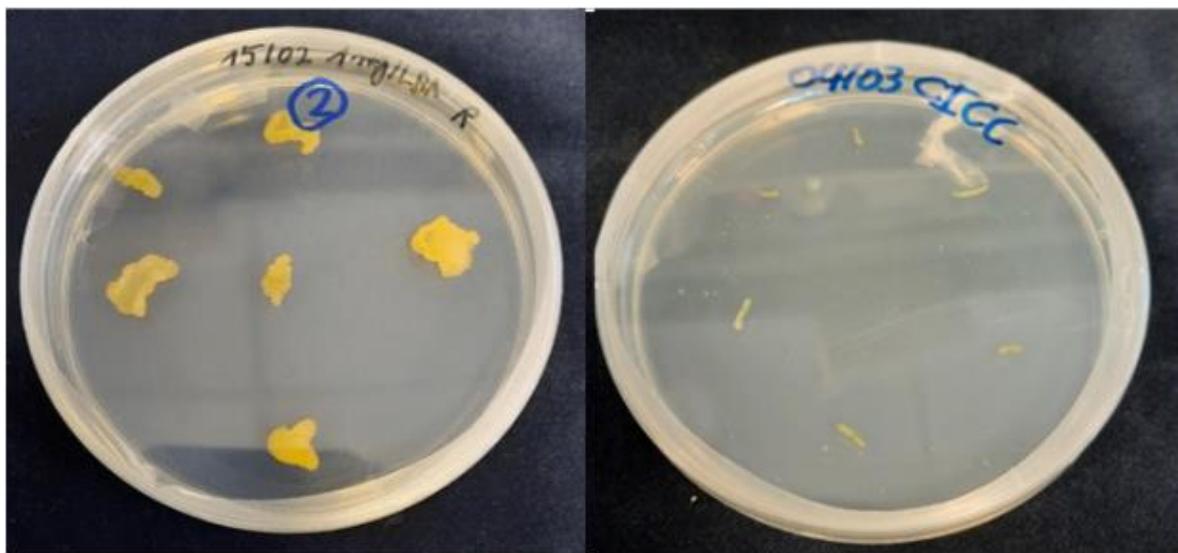


Figura 13 . Bolsas de semillas de las variedades seleccionadas y callos de *Antirrhinum majus* var.Royal Bride y *Antirrhinum majus* var Antirrhinum Lucky Lips.

3.3.1 Extracción de ARN

Los callos de las distintas variedades de *Antirrhinum* seleccionadas fueron triturados con un mortero hasta que el material vegetal quedase reducido a polvillo. Una vez molidas las muestras se extrajo el ARN de cada variedad mediante el kit “NucleoSpin® RNA Plant kit de Macherey-Nagel” según las instrucciones del proveedor.

3.3.2 Transcripción de ARN a ADN de copia

La retrotranscripción de ARN en cADN (ADN de copia) permite la amplificación de los genes de interés debido al hecho de que la Taq polimerasa sólo puede amplificar ADN a partir de ADN.

La transcripción inversa se realiza mediante la Maxima H Minus Reverse Transcriptase de Thermo Scientific, que contiene la enzima transcriptasa inversa, un tampón y el cebador oligoDT. A esta mezcla se añadieron 200ng de ARN. Las condiciones de retrotranscripción fueron: 10 min a 25°C, 15 min. a 50°C, 5 min. y 85°.

3.3.3 PCR Cuantitativa

La qPCR se realizó en el termociclador Stratagene Mx3000P Agilent Technologies con tres réplicas biológicas de cada variedad y tres réplicas técnicas, la reacción de la PCR contenía el 2 µl de cADN molde, 5 µl de PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 microlitros de cada cebador (10 microMolar) en un volumen total de 10 µl. Como gen de referencia se aplicó el gen Ubiquitina (Mayona et al, 2010).

Los cebadores de todos los genes analizados están listados en la tabla S2 del ANEXO

Las condiciones de qPCR fueron las siguientes;

50°C 2'(hotstar)

95°C 2'(Initial desnaturalization)

95°C 15" desnaturalization

60°C 15" 35X primer anidado

72°C 15" síntesis de ADN

3.3.3.1 Cálculo de los niveles de expresión.

El nivel de expresión fue calculado usando el método Delta CT aplicando la siguiente ecuación: (Ecuación 1) (Marcolin-Gomes J et al).

$$\Delta Ct = 2^{-(Ct \text{ reference gene} - Ct \text{ experimental gene})}$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Optimización del cultivo in vitro tras la transformación de *Agrobacterium* en *Petunia* y *Nicotiana*.

Los resultados de los experimentos que se realizaron infectando tanto en hojas de *Petunia* como de *Nicotiana* con *Agrobacterium tumefaciens* recombinante fueron registrados en tablas con la intención de cuantificar la formación de callos, las contaminaciones y la cantidad de plantas traspasadas a maceta con éxito respecto a la aplicación con cefotaxima.

- *Petunia hybrida*

El protocolo de transformación que se tomó como base, apelaba a una correcta infección y finalmente la transformación de plantas con *Agrobacterium tumefaciens* sin el empleo de ningún lavado de hojas con antibióticos como requisito indispensable en el procedimiento. En el presente trabajo se pretendió medir los niveles de efectividad de dicha transformación, así como su evolución según la aplicación de un lavado de hojas con cefotaxima tras la infección y el momento de aplicación.

En la siguiente tabla (Tabla 3), podemos comparar los resultados de los diferentes experimentos (apartado 3.2.2) manifestados en hojas de *Petunia hybrida*.

Tabla 3. Resultados de las hojas de *Petunia hybrida* transformadas

Parámetros	Experimento modelo	Experimento A	Experimento B
N.º de placas totales del experimento	6	10	15
N.º placas contaminadas	2	2	0

N.º hojas totales transformadas	50	106	120
N.º hojas contaminadas	8	8	0
% de hojas contaminadas	16	7,5	0
N.º callos totales formados	42	0	83
% de hojas que desarrollaron un callo	84	0	69,2
N.º callos con tallos	32	0	21
% de callos que desarrollaron tallos	76,2	0	25,3
N.º tallos con raíz	25	0	9
% de tallos que desarrollaron raíces	78,1	0	42,86
N.º callos infectados	1	0	0
% de callos inyectados	1,4	0	0
N.º plantas (tallos con raíces) sobrevivientes a maceta	4	0	3

A nivel general, tanto en *Petunia* como *Nicotiana* el Experimento A fue el que peores resultados reflejó ya que ni siquiera consiguió la formación de ningún callo y su aspecto fue debilitándose progresivamente hasta adquirir una apariencia totalmente seca. Esto puede deberse al bajo tiempo de exposición de los explantes en el medio bacteriano por su rápida eliminación con cefotaxima pocos minutos después de realizar la inoculación, dificultando así la correcta incorporación e infección de las hojas por las bacterias. De esta forma se confirma el eficaz papel antibactericida de la cefotaxima como antibiótico de protección ante infecciones y eliminación de *Agrobacterium*.

El experimento B en hojas de *Petunia* fue el que mejores resultados mostró en cuanto al número de infecciones ya que no se desarrolló ninguna contaminación en las placas inoculadas. Además, el porcentaje de callos totales formados no era demasiado inferior a los que se generaron en el experimento modelo, aunque si tardaron más tiempo en formarse con respecto a los callos generados en el experimento modelo. Sin embargo, se manifestaron serios problemas en el desarrollo radicular y elongación del tallo, haciendo que muy pocas plantas desarrolladas a partir de este experimento pudieran pasar a maceta. La dificultad de los callos para formar tallos y finalmente raíces puede deberse a la influencia de la

concentración de cefotaxima aplicada en dichos parámetros como se ha encontrado en diferentes cultivos, incluyendo *Brassica rapa* L, en donde cefotaxima inhibe la rediferenciación a una concentración relativamente baja y provoca un retraso en la morfogénesis de órganos (Horsch,1985). En callos embriogénicos de *Zea mays* LL, el crecimiento y la morfogénesis de estos depende de la concentración de cefotaxima con efectos ópticos a 150mg/l (Danilova & Dolgikh,2004).

El experimento modelo partía con la hipótesis de ser el que mejor comportamiento mostrará respecto a la correcta obtención de plantas transgénicas como resultado final. Sin embargo, a pesar del alto número de callos formados y el correcto desarrollo de raíces y callos que permitía trasplantar las plantas a maceta, los resultados no fueron notablemente mejores en comparación con el número de callos formados en el experimento B debido a las múltiples contaminaciones que aparecían en las placas como consecuencia de la ausencia de cefotaxima. Por lo tanto, al no emplear cefotaxima, la infección con *Agrobacterium* fue superior ya que la bacteria pudo infectar con éxito todas las hojas de *Petunia*, pero se perdieron muchos callos debido a la aparición de contaminaciones.

- *Nicotiana benthamiana*

En la transformación de hojas de *Nicotiana* (Tabla 4), el experimento A también fué el que peores resultados manifestó, a pesar de que el aspecto que presentaba dejaba totalmente claro la imposibilidad de desarrollarse en ellas ninguna estructura callosa, la apariencia blanquecina que reflejaban no dejaba claro que se debiera a problemas de infección de las bacterias puesto que no se han realizado tantos estudios acerca del comportamiento de la transformación y su reacción frente a la cefotaxima de dicha planta. Finalmente, este experimento acabó desechado sin obtener resultados significativos.

El experimento B reflejó mucho más éxito en la formación de callos y no desarrolló ninguna contaminación como también ocurre en este mismo experimento realizado en hojas de *petunia*. Sin embargo, la dificultad de desarrollar raíces y tallos fue mucho mayor por lo que a pesar de la formación de callos no se consiguió regenerar ninguna planta completa a partir de este experimento.

El experimento modelo en hojas de *Nicotiana* permitió formar callos, de los cuales más de la mitad consiguieron desarrollar raíces y tallo gracias a la ausencia de cefotaxima que no limitó su crecimiento. Es importante resaltar que el número de contaminaciones fue mucho mayor que en el resto de experimentos realizados.

Tabla 4. Resultados de las hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas

Parámetros	Experimento modelo	Experimento A	Experimento B
N.º de placas totales del experimento	8	10	6
N.º placas contaminadas	4	0	0
N.º hojas totales transformadas	75	75	42
N.º hojas contaminadas	19	0	0
% de hojas contaminadas	25,33	0	0
N.º callos totales formados	19	0	14
% de hojas que desarrollaron un callo	25,33	0	33,33
N.º callos con tallos	10	0	0
% de callos que desarrollaron tallos	52,63	0	0
N.º tallos con raíz	10	0	0
% de tallos que desarrollaron raíces	52,63	0	0
N.º callos infectados	9	0	0
% de callos infectados	47,37	0	0
N.º plantas (tallos con raíces) sobrevivientes a maceta	4	0	0

En resumen, la ausencia del lavado con cefotaxima (experimento modelo) aumentó el número de contaminaciones tanto en *Nicotiana* como *Petunia*. Estas infecciones fueron más frecuentes al principio del proceso cuando las placas aún no habían desarrollado callo y fueron disminuyendo su intensidad conforme evolucionaban las hojas. El número de callos totales formados fue considerablemente superior que los registrados en las otras variedades del experimento, así como aquellos callos que desarrollaron tallos. En cuanto al desarrollo radicular, fue bastante deficiente a pesar de complementar el medio con hormonas estimulantes de estos órganos, es por eso por lo que a pesar del gran número de callos traspasados a medios de enraizamiento muy pocos acabaron desarrollando plantas completas en maceta.

Exp A: Todas las hojas de este experimento, tanto de *Petunia* como de *Nicotiana* obtuvieron un color blanco y textura blanda. En *Nicotiana* el color blanco no tiene porque ser significado de que no sean plantas transgénicas ya que no hay tantos estudios acerca de las características de hojas transformadas que nos permita conocer cómo debería de ser su desarrollo. Sin embargo, con la finura que se observa en las hojas de *Nicotiana* podemos asegurar que no llegaron a desarrollar callo. En *Petunia* se pudo observar una lenta evolución y desarrollo de las hojas pero que finalmente acabaron pálidas y blandas e incluso con zonas transparentes, presentaban un aspecto seco y muerto debido a que el temprano lavado con cefotaxima pudo haber dificultado la correcta infección de los Agros.

Exp B: No se produjeron problemas de contaminación ni infecciones durante el desarrollo de los explantes a pesar de lavar con cefotaxima dos días después del contacto con las bacterias. La mayoría de las hojas infectadas desarrollaron callos grandes y compactos de colores verde oscuro, aunque tardaron bastante tiempo en desarrollarse. De los callos formados solo se consiguieron pasar a maceta solo el 7 % en *Petunia* posiblemente debido al bajo éxito de la transformación.

4.2 Análisis de niveles de expresión en genes candidatos involucrados en el desarrollo de callos de *Antirrhinum*:

La tabla 5 muestra los valores delta Ct, es decir, la expresión relativa y normalizada de genes candidatos para el desarrollo de callos, en tres variedades con diferentes características del desarrollo del callo a partir de hipocotílos. Los valores delta Ct fueron calculados en base a los valores Ct del gen de normalización y del gen candidato (Tabla S3). Debido a la no “amplificación” del gen de normalización o del gen candidato en algunas muestras, no se ha podido calcular el valor de delta Ct para todas las réplicas.

Tabla 5. Expresión relativa delta t de genes candidatos en callos de 3 variedades de *Antirrhinum majus*

	Replica biológica	Réplica técnica	Crf	CYC	AL5	IAA
Lucky Lips	a	1				
		2				
Lucky Lips	b	1	0,00	17,63	0,82	1031,12
		2	0,00		1,38	749,61
Lucky Lips	c	1	0,08		1,34	3200797,55
		2				5199710,96
		Promedio	0,03	17,63	1,18	2100572,31
		Desviación	0,05	17,63	0,31	2558155,88
Royal Bride	a	1	0,01	0,02	1,34	6841,04

Royal Bride	b	2	0,01	0,02	1,10	5712,87	
		1	0,01	0,01	0,87	8451,55	
Royal Bride	c	2	0,01	0,00	0,90	6295,04	
		1					
		2					
			Promedio	0,01	0,01	1,05	6825,12
			Desviación	0,00	0,01	0,22	1178,08
Rembrandt	a	1	0,04	0,03	1,36	27554,49	
		2		0,02	0,61	18561,17	
Rembrandt	b	1			0,00	3929,15	
		2					
Rembrandt	c	1				3313673,43	
		2	0,04		0,70	1482910,40	
			Promedio	0,04	0,02	0,67	969325,73
			Desviación	0,00	0,00	0,56	1456246,22

La tabla S4 muestra un análisis de las diferencias significativas en el nivel de expresión de genes candidatos involucrados en el desarrollo de callos pertenecientes a tres variedades de *Antihirrinum majus* en base a la herramienta estadística de la prueba “T studentes”. Para establecer los resultados se siguió la siguiente relación en la que cuando los valores $p \leq 0,05$ se considera que presentan una diferencia no significativa. Ensayos de diferentes autores demuestran que los genes analizados se encontraban sobre expresados en callos de las especies *Arabidopsis thaliana* y *Camelia sinensis* durante el desarrollo del callo. (Gao *et al.*, 2019) (Luo *et al.*, 2018) (Mizukami and Fischer, 2000).

Sin embargo, los niveles de expresión de los genes analizados en el laboratorio a partir de las distintas variedades de *Antirrhinum majus* que mostraban diferencias significativas en el desarrollo de sus callos generados a partir de hipocotilos en condiciones *in vitro* no fueron significativos ya que los valores p eran superiores a 0,05. Por lo tanto, la expresión de los genes seleccionados no puede utilizarse como marcados en el nivel de crecimiento de callos de *Antirrhinum*. Por otro lado, cabe destacar el alto nivel de expresión relativa del gen *INDOLES-3-ACETIC ACID (IAA)* respecto al resto de genes, posiblemente debido a la suplementación del medio de inducción de callos con NAA y 2,4D. El gen *IAA*, inducido por auxinas (Reed, 2001) pertenece a la familia de genes *Aux/IAA* y está involucrado en la respuesta a auxina. Estos genes se caracterizan por manifestar distintas funciones en el desarrollo de las plantas como el desarrollo de las raíces, el crecimiento de brotes y la maduración de frutos (Luo *et al.*, 2018).

5. CONCLUSIONES

- Respecto a la optimización del protocolo de transformación en plantas modelo, podemos concluir que el experimento que mejores resultados manifestó finalmente fue el que procedió al lavado de hojas de *Petunia* y *Nicotiana* dos días después de la infección con *Agrobacterium* (Exp B).
- La aplicación de cefotaxima pocos minutos después de realizar las inoculaciones fue descartada debido a la ausencia de muestras concluyentes posiblemente provocado por el posible efecto inhibitor de la cefotaxima sobre *Agrobacterium*.
- A pesar de la considerable dificultad de desarrollar tallos y raíces en los explantes del experimento B, la prevención de contaminaciones no supuso alteraciones en la correcta infección de los tejidos generando un porcentaje de callos muy similar a los producidos siguiendo el protocolo modelo.
- Realizar un lavado con cefotaxima pocos días después de infectar el tejido vegetal con *Agrobacterium* es una técnica recomendable para asegurar el menor número de contaminaciones que acaben desechando el trabajo realizado sin producir problemas en la transformación.
- Para mejorar el desarrollo de tallos y raíces proponemos aplicar menores concentraciones de cefotaxima durante el lavado y trabajar con medios de cultivo complementados con hormonas estimulantes en el desarrollo de dichos órganos como por ejemplo; sustancias de la familia de las auxinas; ácido indol-3-acético, ácido α -naftalenacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ácido indolbutírico. Compuestos gibereleicos como ácido abscísico y citoquininas como zeatina y B.A.P.
- La expresión de genes marcadores del desarrollo de callo, no manifestaron diferencias significativas en la expresión génica entre variedades de *Antirrhinum majus*, debido a una varianza muy alta entre muestras.
- Los genes seleccionados no se pudieron considerar como marcador para el nivel de crecimiento de callo en *Antirrhinum*.

- Sugerimos un posible experimento futuro que consista en la secuenciación del transcriptoma de las diferentes variedades de *Antirrhinum* seguido de un análisis de los genes diferencialmente expresados para la identificación y detección de nuevos genes candidatos involucrados en el desarrollo de los callos.

6. BIBLIOGRAFIA

- Brandoli, C., Petri, C., Egea-Cortines, M., & Weiss, J.** (2020). Gigantea: Uncovering new functions in flower development. *Genes*, *11*(10), 1142.
- Brouwers, R., Vass, H., Dawson, A., Squires, T., Tavaddod, S. y Allen, RJ** (2020). Estabilidad de antibióticos β -lactámicos en medios de crecimiento bacteriano. *PLoS uno*, *15* (7), e0236198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236198>
- Cabrera-Ponce, J.L. and Irapuato, G.C.-I.C.G.** TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS.
- Castillo, A.** (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA, Uruguay*.
- Che, P., Lall, S., Nettleton, D. and Howell, S.H.** (2006) Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture. *Plant Physiol*, **141**, 620–637.
- Deshpande, A. R., Pochapsky, T. C., & Ringe, D.** (2017). The metal drives the chemistry: Dual functions of acireductone dioxygenase. *Chemical reviews*, *117*(15), 10474-10501.
- Deshpande, A.R., Wagenpfeil, K., Pochapsky, T.C., Petsko, G.A. and Ringe, D.** (2016) Metal-dependent function of a mammalian acireductone dioxygenase. *Biochemistry*, **55**, 1398–1407.
- Dewitte, W., Scofield, S., Alcasabas, A.A., et al.** (2007) Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 14537–14542.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R.** (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *106*(1), 85-125.
- Du, X., Fang, T., Liu, Yan, Huang, L., Zang, M., Wang, G., Liu, Yunjun and Fu, J.** (2019) Transcriptome Profiling Predicts New Genes to Promote Maize Callus Formation and Transformation. *Front. Plant Sci.*, **10**. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01633/full> [Accessed June 29, 2021].
- Estopà, M., Marfa, V., Mele, E., & Messeguer, J.** (2001). Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of Agrobacterium with kanamycin selection in carnation. *Plant cell, tissue and organ culture*, *65*(3), 211-220.

- Gao, Y., Zhao, M., Wu, X.-H., Li, D., Borthakur, D., Ye, J.-H., Zheng, X.-Q. and Lu, J.-L.** (2019) Analysis of Differentially Expressed Genes in Tissues of *Camellia sinensis* during Dedifferentiation and Root Redifferentiation. *Sci Rep*, **9**, 2935.
- Gómez-Márquez, J.** (2013). La revolución de la ingeniería genética. *Nova Acta Científica Compostelana*, **20**.
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., & Lommel, S. A.** (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Molecular plant-microbe interactions*, **21**(8), 1015-1026.
- Granados, C.D. and Giraldo, A.C.** (2012) Métodos de transformación genética de plantas. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, **15**, 49–61.
- Groß-Hardt, R., Lenhard, M., & Laux, T.** (2002). WUSCHEL signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. *Genes & Development*, **16**(9), 1129-1138.
- Guo, Q., Liu, Q., A. Smith, N., Liang, G. and Wang, M.-B.** (2016) RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. *Current Genomics*, **17**, 476–489.
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J.L. and Rodríguez, B.** (2003) Mejoramiento genético vegetal in vitro. *e-Gnosis*, **0**.
- Healy, J. M. S., Menges, M., Doonan, J. H., & Murray, J. H.** (2001). The *Arabidopsis* D-type Cyclins CycD2 and CycD3 Both Interact in Vivo with the PSTAIRE Cyclin-dependent Kinase Cdc2a but Are Differentially Controlled *. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(10), 7041-7047. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009074200>
- Horsch, R., Fry, J., Ho mann, N., Eichholtz, D., Rogers, S. and Fraley, R.** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science (New York, N.Y.)*, **227**, 1229–31.
- Horsch, R.B., Rogers, S.G. and Fraley, R.T.** (1985) Transgenic plants. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 433–437.
- Huanca-Mamani, W.** (2013) El Lado Desconocido de las Plantas Transgénicas. *Idesia (Arica)*, **31**, 3–5.
- Jeon J, Cho C, Lee MR, Van Binh N, Kim J.** CYTOKININ RESPONSE FACTOR2 (CRF2) and CRF3 Regulate Lateral Root Development in Response to Cold Stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.

2016 Aug;28(8):1828-43. doi: 10.1105/tpc.15.00909. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27432872; PMCID: PMC5006697.

Jeon, J., Cho, C., Lee, MR, Van Binh, N. y Kim, J. (2016). EI FACTOR DE RESPUESTA A LA CITOCININA 2 (CRF2) y el CRF3 regulan el desarrollo de la raíz lateral en respuesta al estrés por frío en Arabidopsis. *La célula vegetal*, 28 (8), 1828–1843. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00909>

Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T. and Davies, B. (2006) Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell*, **18**, 560–573.

Kozera, B. and Rapacz, M. (2013) Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*, **54**, 391–406

LA BIOTECNIA, Y. E. S. A. (1994). ANALISIS Y COMENTARIOS. *AGRONOMIA MESOAMERICANA*, 5, 140-158.

Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Trejo-Reveles, V., Muñoz-Soto, R. B., & López-Camacho, C. (2016). La revolución en ingeniería genética: Sistema CRISPR/Cas. *Investigación en Discapacidad*, 5(2), 116-128.

Losa, A., Colombo, M., Brambilla, V., & Colombo, L. (2010). Genetic interaction between AINTEGUMENTA (ANT) and the ovule identity genes SEEDSTICK (STK), SHATTERPROOF1 (SHP1) and SHATTERPROOF2 (SHP2). *Sexual plant reproduction*, 23(2), 115-121.

Luo, J., Zhou, J.-J. and Zhang, J.-Z. (2018) Aux/IAA Gene Family in Plants: Molecular Structure, Regulation, and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 259.

Luo, J., Zhou, J.-J., & Zhang, J.-Z. (2018). Aux/IAA Gene Family in Plants: Molecular Structure, Regulation, and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 259. <https://doi.org/10.3390/ijms19010259>

Mallona, I., Lischewski, S., Weiss, J., Hause, B., & Egea-Cortines, M. (2010). Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-4>

Mallona, I., Lischewski, S., Weiss, J., Hause, B., & Egea-Cortines, M. (2010). Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-4>

- Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2012) Quantitative levels of Deficiens and Globosa during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **72**, 294–307.
- Marcolin-Gomes J, Rodrigues FA, Fuganti-Pagliarini R, Bendix C, Nakayama TJ, Celaya B, et al.** Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. Cermakian N, editor. N, editor. PLoS One. 2014;9e86402.
- Mizukami, Y. and Fischer, R.L.** (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 942–7.
- Mizukami, Y., & Fischer, R. L.** (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(2), 942-947.
- Montoliu, L. y Martínez Mojica, F.,** 2021. *Editando genes* . 3ra ed. Pamplona: Editoriales de al lado.
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M.** (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia*, 19-40.
- Naderi, D., Askari-Khorasgani, O., & Mahmoudi, E.** (2016). Cefotaxime and Benzyladenine Improve Melon Regeneration. *Iranian Journal of Biotechnology*, **14**(1), 56-60. <https://doi.org/10.15171/ijb.1077>
- Naderi, D., Askari-Khorasgani, O. y Mahmoudi, E.** (2016). La cefotaxima y la bencilina mejoran la regeneración del melón. *Revista iraní de biotecnología* , **14** (1), 56-60. <https://doi.org/10.15171/ijb.1077>
- Reed, J. W.** (2001). Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, **6**(9), 420-425. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02042-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02042-8)
- Rubio Gardiel, J.** (1973). *GENETICA, SU POSICION ENTRE LAS CIENCIAS BIOLOGICAS*. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/11650/1/GENETICA,%20SU%20POSICION%20ENTRE%20LAS%20CIENCIAS%20BIOLOGICAS.PDF>

- Samara Shekar Reddy, S., Singh, B., Peter, AJ y Venkateswar Rao, T.** (2018). Producción de cultivares locales transgénicos de arroz (*Oryza sativa* L.) para mejorar la tolerancia a la sequía utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium* . *Revista saudí de ciencias biológicas*, 25 (8), 1535–1545. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.035> (Retracción publicada en Saudi J Biol Sci. 2019 Jul;26(5):1093)
- Somssich, M., Je, B. I., Simon, R., & Jackson, D.** (2016). CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*, 143(18), 3238-3248.
- Terry López, M. I., Weiss, J. R., & Egea Gutiérrez-Cortines, M.** (2016). Efecto de la kanamicina en la germinación y desarrollo de la boca de dragón (*Antirrhinum majus*).
- Valderrama, A. M.** (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería genética natural aplicada". *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58(1), 2569-2585.
- Valderrama, A.M.** (2005) Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería genética natural aplicada." *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58, 2569–2585.
- Xu, K., Liu, J., Fan, M., Xin, W., Hu, Y. and Xu, C.** (2012) A genome-wide transcriptome profiling reveals the early molecular events during callus initiation in *Arabidopsis* multiple organs. *Genomics*, 100, 116–124.

7. WEBGRAFÍA

Addgene.org. 2022. *Addgene: Guía CRISPR* . [en línea] Disponible en: <<https://www.addgene.org/guides/crispr/>> [Consultado el 25 de marzo de 2022].

Bioinfo.cnb.csic.es. 2022. *Breaking-Cas: gRNA libres fuera de los objetivos para la tecnología CRISPR/Cas* . [en línea] Disponible en: <<https://bioinfo.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>> [Consultado el 25 de marzo de 2022].

Bioinfo.sibs.ac.cn. 2022. *Base de datos del genoma de Antirrhinum* . [en línea] Disponible en: <<http://bioinfo.sibs.ac.cn/Am/>> [Consultado el 12 de enero de 2022].

Goldbio.com. 2022. *Una guía para los vectores binarios de ADN-T en la transformación de plantas | GoldBio* . [en línea] Disponible en: <<https://www.goldbio.com/articles/article/a-guide-to-agrobacterium-t-dna-binary-vectors>> [Consultado el 24 de enero de 2022].

Leiva Brondo, M., 2022. *Universitat Politècnica de València* . [en línea] Youtube.com. Disponible en: <<https://www.youtube.com/watch?v=hcdNsjX4yF4>> [Consultado el 21 de enero de 2022].

Montoliu, L., 2022. *montoliu.naukas* . [en línea] Youtube.com. Disponible en: <<https://www.youtube.com/watch?v=tKJv3TLPJuA>> [Consultado el 3 de enero de 2022].

Montoliu, L., 2022. *Mi vida profesional antes y después de CRISPR - Gen-Ética*. [en línea] Gen-Ética. Disponible en: <<https://montoliu.naukas.com/2022/01/23/mi-vida-profesional-antes-y-despues-de-crispr/>> [Consultado el 15 de enero de 2022].

Muntada, M., 2022. *¿Cómo se aplica la ingeniería genética en plantas?*. [en línea] Todo lo que necesitas es biología. Disponible en: <<https://allyouneedisbiology.wordpress.com/2016/06/03/ingenieria-genetica/>> [Consultado el 19 de febrero de 2022].

Ortonobes, S., 2022. *La Hiperactina* . [en línea] Youtube.com. Disponible en: <<https://www.youtube.com/watch?v=UaxrYWCyLdY>> [Consultado el 5 de enero de 2022].

ANEXO I

INFORMACIÓN ADICIONAL DE MATERIAL EMPLEADO, GENES CANDIDATOS,
RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN Y GASTOS FUNGIBLES.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla S 1. Genes candidatos involucrados en el desarrollo de callos de <i>Antihirrinum majus</i>	55
Tabla S2. Cebadores Empleados.....	55
Tabla S3. Valores CT de genes candidatos y del gen de referencia en tres réplicas de callos de tres variedades de <i>Antihirrinum majus</i>	56
Tabla S4. Resultados de la prueba T de Student para analizar diferencias significativas entre los valores delta CT de genes candidatos involucrados en el desarrollo de callo en tres variedades de <i>Antirrhinum majus</i>	56
Tabla S5. Cálculo de gastos fungibles para la generación de una planta transgénica con mutaciones génicas por el método CRISPR/Cas (generación T0)	1

ANEXO I

Tabla S 1. Genes candidatos involucrados en el desarrollo de callos de *Antihirinum majus*

Gen	Planta	Nivel de expresión en la inducción del callo	Función	Referencia
<i>CRF 3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>		Inicio de desarrollo de raíces laterales bajo condiciones de estrés por frío	
<i>INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)</i>	<i>Camelia sinensis</i>	Sobre-expresión	IAA, familia de genes tempranos que responden a auxinas, esencial para la transducción de señalización de auxinas. Un mayor nivel de expresión en los callos puede ser un indicador de una elevada capacidad de respuesta a las auxinas	(Gao <i>et al.</i> , 2019) (Luo <i>et al.</i> , 2018)
<i>AINTEGUMENTA-LIKE 5 (AL5)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Desconocido	El grupo ANT comprende los genes AINTEGUMENTA-LIKE 5 (AL5) implicados en procesos relacionados con el crecimiento de plantas (Mizukami and Fischer, 2000).	(Mizukami and Fischer, 2000)
<i>CYCLIND D 3;1 (CYC)</i>	<i>Camelia sinensis</i>	Sobre-expresión	Marcador de división celular. Marca en índice miótico	(Gao <i>et al.</i> , 2019) (Dewitte <i>et al.</i> , 2007)

Tabla S2. Cebadores Empleados

Gen	Foward	Reverse
Ubiquitina	GGCTGAAGTCTTCCCTCTGG (GC content: 0.6, length: 20)	ATAGGCAAAGGCACAACGGA (GC content: 0.5, length: 20)
Índole-3-Acetic Acid (IAA)	GCACAAGTTGTTGGATGGCC (GC content: 0.55, length: 20)	CACACCAATGCAGGGCTCTA (GC content: 0.55, length: 20)

CYDCD3-1 (CYC)	TCCTCTTCTCTTCTCCCGCT (GC content: 0.55, length: 20)	CACACCAATGCAGGGCTCTA (GC content: 0.55, length: 20)
Aintegumenta-like 5 (AL5)	CACTAAGCCCCACCCAAACA (GC content: 0.55, length: 20)	GTCGAGCACGGTTAGTCCTT (GC content: 0.55, length: 20)
CRF3 (Cytokinin response factor)	AGTACCCCAAGTTGCTGCAA (GC content: 0.5, length: 20)	GGGGTGTTCCTGTGTC (GC content: 0.6, length: 20)

Tabla S3. Valores CT de genes candidatos y del gen de referencia en tres réplicas de callos de tres variedades de *Antirrhinum majus*

Variedad	Réplica biológica	Réplica técnica	Ubi*	Crf	CYC	AL5	IAA
Lucky Lips	a	1		31,93	10,91	31,49	9,42
		2		31,8	10,95	34,87	12,4
Lucky Lips	b	1	22,31	32,1	18,17	22,6	12,3
		2	22,48	32,3		22,02	12,93
Lucky Lips	c	1	31,12	34,78		30,7	9,51
		2	30,85			31,09	8,54
Variedad	Réplica biológica	Réplica técnica	Ubi*	Crf	CYC	AL5	IAA
Royal Bride	a	1	25,29	31,765	30,6	24,87	12,55
		2	24,95	31,13	30,7	24,81	12,47
Royal Bride	b	1	25,325	31,71	30,98	25,53	12,28
		2	25,11	31,63	31,43	25,26	12,49
Royal Bride	c	1		32,8	13,23	31,3	10,58
		2		32,8	13,98		10,75
Variedad	Réplica biológica	Réplica técnica	Ubi*	Crf	CYC	AL5	IAA
Rembrandt	a	1	26,64	31,46	31,94	26,2	11,89
		2	26,06		31,71	26,78	11,88
Rembrandt	b	1	20,01			30,66	8,07
		2				32,9	29,98
Rembrandt	c	1	28,74	31,945	21,24	27,99	7,08
		2	27,45	32,28		27,97	6,95

Tabla S4. Resultados de la prueba T de Student para analizar diferencias significativas entre los valores delta CT de genes candidatos involucrados en el desarrollo de callo en tres variedades de *Antirrhinum majus*

Gen CRF	Lucky Lips	Royal Bride	Rembrandt
Lucky Lips		0,52	0,714
Royal Bride	0,52		0,605

Rembrandt	0,71	0,60	
<i>Gen CYC</i>	Lucky Lips	Royal Bride	Rembrandt
Lucky Lips		0,36	0,54
Royal Bride	0,36		0,23
Rembrandt	0,54	0,23	
<i>Gen AL5</i>	Lucky Lips	Royal Bride	Rembrandt
Lucky Lips		0,56	0,29
Royal Bride	0,56		0,31
Rembrandt	0,29	0,31	
<i>Gen IAA</i>	Lucky Lips	Royal Bride	Rembrandt
Lucky Lips		0,15	0,43
Royal Bride	0,15		0,23
Rembrandt	0,43	0,23	

Tabla S5. Cálculo de gastos fungibles para la generación de una planta transgénica con mutaciones génicas por el método CRISPR/Cas (generación T0)

Tarea y función	Nombre de productos necesarios	Proveedor producto	Precio producto (€)	Precio (euros) para generar una planta transgénica
Diseño del plásmido	Plásmido con construcción CRISPR /Cas	Genescript	175,00 /plásmido	175,00 (1 plásmido)
Transformación de <i>Agrobacterium</i>	Cuveta para transformar <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Biorad	26,80/unidad	26,80 (1 cuveta)
Preparación de medio de cultivo y de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Medio de crecimiento YEB: Sacarosa Extracto de carne Extracto de levadura Peptona Kanamicina Espectinomicina Rifampicina MgSO ₄ Agar Placas Petri	PanReac PanReac PanReac PanReac Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich ThermoFisher	57,00/1kg 133,30/500g 90,40/500g 95,60/500g 118,00/5g 172,00/1g 152,00/5g 144,00/500g 76,10/250g 168,62/500 ud.	Para 1L (líquido y sólido) 0,27(5g) 1,33(5g) 0,18(1g) 0,96(5g) 1,18 (50mg/ml) 1,72 (50mg/ml) 1,52 (50mg/ml) 0,35(10ml de 1M) 3,00/10g 0,67/2ud. Total: 11,18
Minipreparación de plásmido	Kit para Minipreps	ThermoFisher	292,00/250 ud.	7,00 (6 ud.)
Comprobación de <i>Agrobacterium</i> transformado por PCR y electroforesis	PCR: Cebadores Taq polimerasa MIX Electroforesis: Agarosa TAE buffer 10x	ThermoFisher Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich	5,00/ud. 66,00/250 ud. 71,40/100g 46,00/1L	0,16(4 PCRs) 1,00 (4 PCRs) 0,71 (1 gel) 1,38 (300ml) Total: 3,13
Desinfección y sembrado de semillas y <i>Agrobacterium</i> transformado por PCR y electroforesis	Lejía (50%) Medio de cultivo Sacarosa MS(Murashige&Skoog) Phytigel Placas Petri	PanReac Duchefa Sigma Aldrich ThermoScientific	0,86 /L 57,00/1kg 39,40/75L 379,00/1kg 168,62/500 ud.	0,09/50ml 1L medio cultivo: 1,71(30g) 0,52 (1L) 1,67(4,4g) 0,67(2ud.) Total: 4,66

Transformación de hojas y regeneración de plántulas transgénicas	Medio “co-cultivo (C), Medio selectivo (S) Medio de enraizamiento (R): Sacarosa MS(Murashige&Skoog) Phytigel Placas Petri Kanamicina Cefatoxima Carbenicilina NAA BAP IBA Substrato para maceta	PanReac Duchefa Sigma Aldrich ThermoScientific Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich Sigma Aldrich CampoSana	57,00/1kg 39,40/75L 379,00/1kg 168,62/500 ud. 118,00/5g 312,00/1g 53,50/250 mg 30,30/25g 38,4/1g 24,5/1g 9,99/50L	1L medio C 1L medio S 1L medio R 5,13(3x30g/L) 1,58 (3x1L) 5,01 (3x4,4g/L) 10,11 (30 ud.) 14,16(2x300mg/L) 6,42(30mg/100ml) 214,00(2x500mg/L) >0,10(2x0,1mg/L) 0,15(2x2mg/L) 0,13(1x5mg/L) 0,99(5L) Total: 257,68
Extracción de gADN de hojas para identificar transgénicos	Extraccion de 8 pantas candidatos Kit ADN plantas	Macherey & Nagel	878,00/100 preps	70,24 (8 preps)
PCRs para identificar plantas con el transgen	Amplificación de gRNA y CAS 2 x 8 reacciones de PCR		0,30/PCR	4,80 (16 PCRs)
PCRs para identificar mutación	Amplificación de un fragmento del gen de 4 plantas candidatos + controles		0,30/PCR	5,40 (18 PCRs)
Clonación de fragmentos amplificados y preparación de ADN plasmídico	Bacterias competentes pGEM-T easy sistema de clonación LB: Tryptona Extracto de levadura NaCL Agar Ampicilina Cuveta electroporación Kit para Minipreps	Thermo Fisher Promega PanReac PanReac PanReac Sigma Aldrich Sigma Aldrich BioRad ThermoFisher	109,00 (200 reac.) 188,00 (20 reac.) 95,60/500g 90,40/500g 21,10/kg 76,10/250g 363,00/25g 26,80/ud. 292,00/250 ud.	4,36 (8 reac.) 75,20 (8 reac.) Para 1L LB (½ líquido y ½ sólido) 1,92 (10g) 0,90(5g) 0,11(5g) 1,13(3,75g) 1,45(100mg) 214,40 (8 ud.) 93,44 (80 ud.) Total:85,07
Identificación de mutación por secuenciación	Servicio de secuenciación (UMU)		4,00/reac.	320,00 (80 reac.)

				1278,80 €
--	--	--	--	-----------

