



Universidad de Valladolid

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS
AGRARIAS**

**MÁSTER EN CALIDAD, DESARROLLO E
INNOVACIÓN DE ALIMENTOS**

**Captación de ARN exógeno en plantas de tomate para
la producción de proteínas de interés**

ALUMNA:

Alejandra Bueso Gambín

TUTORES:

María Elena Hidalgo Rodríguez

Jonatan Niño Sánchez

Curso 2023-2024

RESUMEN

La escasez de recursos para abastecer nutricionalmente a una población en constante crecimiento, junto con los cambios de hábitos de los consumidores, que demandan alimentos más saludables y respetuosos con el medio ambiente, ha fomentado la investigación de estrategias que permitan obtener alimentos más ricos nutricionalmente, y que mejoren la sostenibilidad de la producción alimentaria. De esta demanda surgen los alimentos modificados genéticamente, que, aunque plantean una solución a estos retos, levantan diversas controversias y están sometidos a estrictas regulaciones legales. Este trabajo plantea una metodología alternativa, basada en la incorporación de ARN mensajero mediante cultivo hidropónico, para conseguir la expresión temporal de proteínas de interés en las plantas, sin modificar de forma permanente su ADN. En este trabajo se utilizó como modelo el gen *YFP* (*Yellow Fluorescent Protein*), cuya expresión en plántulas de tomate se monitorizó mediante microscopía láser confocal.

Palabras clave: ARN mensajero, expresión temporal, cultivo hidropónico, microscopía confocal.

ABSTRACT

The scarcity of resources to nutritionally support a constantly growing population, combined with changing consumer habits demanding healthier and more environmentally friendly foods, has driven research into strategies for producing more nutritious and sustainable foods. Genetically modified foods have emerged from this demand, offering a solution to current challenges, though they are subject to multiple controversies regarding their safety and strict legal regulations. This work proposes an alternative methodology that incorporates messenger RNA through hydroponic cultivation to achieve temporary expression of proteins of interest in plants without permanently modifying their DNA. In this work, the *YFP* (*Yellow Fluorescent Protein*) gene was used as a model. Its mRNA was introduced into tomato seedlings via hydroponics, and its expression was monitored by means laser scanning confocal microscopy

Keywords: messenger RNA, temporal expression, hydroponic cultivation, confocal microscopy.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	CONTEXTO GENERAL.....	1
1.2.	ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE Y SUS LIMITACIONES 2	
1.3.	INTRODUCCIÓN EXÓGENA DE ARN MENSAJERO: UNA ALTERNATIVA A LOS OGM.....	5
1.4.	ANTECEDENTES.....	5
2.	OBJETIVOS.....	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.....	9
3.1.1.	<i>Bacillus subtilis</i>	9
3.1.2.	<i>Escherichia coli</i>	9
3.2.	MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO BACTERIANO.....	10
3.3.	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	10
3.4.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	11
2.5.	ELECTROFORESIS.....	12
2.6.	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	14
2.7.	LIGAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO pT7:YFP.....	14
2.8.	TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.....	14
2.9.	LINEARIZACIÓN DEL PLÁSMIDO EXTRAÍDO.....	15
2.10.	PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	15
2.11.	TRANSCRIPCIÓN DE ADN A ARN.....	16
2.12.	CULTIVO DE PLANTAS DE TOMATE.....	17
2.13.	MICROSCOPIA.....	17
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
3.5.	CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN DEL GEN YFP.....	18
3.6.	CLONACIÓN DEL GEN YFP EN <i>Escherichia coli</i>	19
3.7.	TRANSCRIPCIÓN <i>IN VITRO</i> DEL GEN YFP.....	23
3.8.	EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA YFP POR LA PLANTA.....	23
4.	CONCLUSIONES.....	26
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del trabajo.	8
Figura 2. Esquema de las células de la bacteria <i>Escherichia coli</i> transformada con el plásmido pT7:YFP, construido en este trabajo.	9
Figura 3. Esquema de un equipo de electroforesis con un gel de agarosa.	13
Figura 4. A: control positivo. B: muestra. C: control negativo.	19
Figura 5. Placas de colonias de <i>Escherichia coli</i> . A y B: placas inoculadas con bacterias transformadas. C: control negativo. Sobre algunas colonias de las placas A y B se verificó la presencia del gen de interés mediante secuenciación posteriormente.	20
Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR a partir de las colonias A4, A5, B4, B5, PET A y PJET B.	21
Figura 7. Alineamiento de las secuencias gen YPF original (YFP extraction) y del producto de secuenciación del plásmido T7:YFP. La barra verde indica homología para cada nucleótido entre las dos secuencias.	22
Figura 8. Electroforesis del ARN mensajero transcrito.	23
Figura 9. Plántulas de tomate cultivadas en hidroponía con ARNm suspendido en la solución de cultivo.	24
Figura 10. Imágenes obtenidas de microscopía confocal. A y B: tallo. C y D: hoja.	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre organismos transgénicos y cisgénicos (Lanka, 2018).	3
Tabla 2. Cultivos transgénicos permitidos para consumo humano o elaboración de piensos en la UE (elaboración propia a partir de los datos del Registro de la UE de OGM autorizados, 2024).	4
Tabla 3. Programa de amplificación por PCR.	12
Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción de PCR realizada para amplificar el plásmido purificado de <i>Bacillus</i>	12
Tabla 5. Composición de la reacción de transcripción de ADN a ARN (Thermo Fischer).	16
Tabla 7. Criterio de selección de bacterias transformadas.	20
Tabla 8. Rangos de emisión y excitación YFP, lignina y clorofila.	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1.CONTEXTO GENERAL

En las últimas décadas, la población mundial ha crecido por encima de todas las predicciones. Alcanzó los 8000 millones a finales de 2022, y se estima que lleguemos a los 9700 millones en 2050, y a 10400 millones en 2080 (Naciones Unidas, s. f.).

Además, los hábitos de consumo y las preocupaciones sociales han cambiado, al incrementarse la concienciación y el interés sobre la salud, el bienestar, y el impacto medioambiental. Como consecuencia, los consumidores ya no solo buscan alimentos que cubran sus necesidades, sino que exigen productos con mayor vida útil, mejor aspecto, un perfil nutricional más completo y que sean más respetuosos con el medio ambiente (FAO, 2017).

Este cambio se ve reflejado en un aumento de publicaciones en este campo, como demostraron Fang *et al.* (2023) en su revisión bibliométrica, donde revelaron el drástico incremento de publicaciones anuales sobre alimentación saludable, pasando de 71 publicaciones en 2017, hasta 1764 en 2021. En esta revisión se señalaron como los principales retos actuales, el cambio climático debido a la agricultura mundial, el incremento de población y la incidencia de las enfermedades no transmisibles.,

En este contexto, es necesario mejorar la sostenibilidad de la producción alimentaria, para lo cual se están empleando diversas estrategias: algunas de ellas se centran en la reducción u optimización del uso del agua mediante riego deficitario o la integración de biocarbón en los suelos (Singh *et al.*, 2019); otras emplean agricultura inteligente, que permite optimizar la racionalización de agua y fertilizantes utilizando un sistema de gestión de datos y la inteligencia artificial, reduciendo la sobredosisificación y el desperdicio (Al-Ammary y Ghanem, 2023). También hay estrategias que tratan de reducir la huella de carbono de la industria durante el procesado de los alimentos, utilizando envases más ecológicos o midiendo el desperdicio alimentario (Bureau Veritas, 2020). Por otro lado, hay planes políticos, como la estrategia europea “De la granja a la mesa”, que busca un sistema alimentario sostenible, que asegure la seguridad alimentaria, y la accesibilidad y nutrición de todos los habitantes (Comisión Europea, 2022). Además, los avances en biotecnología y mejora genética han hecho posible desarrollar plantas resistentes a estreses bióticos (como plagas o enfermedades vegetales) y abióticos (lluvias, sequía, temperaturas extremas o viento) (Verma *et al.*, 2021).

Por otro lado, para cubrir las necesidades y preocupaciones nutricionales de la población, encontramos cada vez más variedad de suplementos externos a la dieta, al alcance de los consumidores. Pero, estas preocupaciones están creciendo a la vez que lo hace la tendencia hacia lo “natural”, de modo que es preferible obtener todos los nutrientes a partir de la dieta, como reflejan Verma *et al.* (2021) en su artículo sobre la obtención de antioxidantes a partir de los alimentos que incluimos en la dieta, para prevenir enfermedades relacionadas con la edad. Sobre esta idea, surge también el desarrollo de alimentos funcionales, cada vez más presentes en el mercado (Grand View Research, 2023), que pueden incluir probióticos, prebióticos, ácidos grasos esenciales y antioxidantes, entre otros compuesto, y suponen un beneficio en la salud a nivel digestivo, cardiovascular e inmunológico (UMD College of Agriculture & Natural Resources, 2023). El empleo de técnicas de ingeniería genética para obtener cultivos biofortificados está presentándose como una solución a las condiciones de deficiencia nutricional que se dan en países en desarrollo, ya que, además de mejorar el contenido en nutrientes, pueden presentar más resistencia a plagas (Mohidem *et al.*, 2022).

1.2. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE Y SUS LIMITACIONES

De las técnicas de mejora genética que se emplean actualmente, cabe destacar la obtención de organismos genéticamente modificados.

Un organismo genéticamente modificado (OGM) es cualquier organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético haya sido modificado de una manera que no se produce de forma natural mediante cruzamiento o en la recombinación natural, siempre que se utilicen las técnicas que reglamentariamente se establezcan (AESAN - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, s. f.).

Pueden clasificarse los OGM, según la técnica de modificación empleada, en transgénicos y cisgénicos (Tabla 1) (Lakna, 2018).

Tabla 1. *Diferencias entre organismos transgénicos y cisgénicos (Lanka, 2018).*

TRANSGÉNICOS	CISGÉNICOS
Los genes introducidos provienen de un organismo sexualmente incompatible, no relacionado.	Los genes introducidos provienen de un organismo sexualmente compatible, no intervienen otras especies.
Pueden contener secuencias reguladoras artificiales.	Los genes se introducen con secuencias promotoras y terminadoras naturales.
Los organismos expresan rasgos novedosos, que pueden afectar a la viabilidad del organismo.	Los organismos no expresan rasgos novedosos, su viabilidad no se ve afectada.
Las características pueden pasar a los descendientes silvestres por flujo genético, es considerado peligroso.	Las características no pasan a los descendientes silvestres, es considerado seguro.

Es importante diferenciar entre OGM y transgénico, ya que todos los transgénicos son OGM, pero no todos los OGM son transgénicos, y por tanto no están sometidos a las mismas regulaciones legales (Chofre, 2020).

Los OGM ofrecen una variedad de beneficios y aplicaciones significativas en la agricultura moderna y la biotecnología. Entre los principales beneficios se encuentran el aumento en la productividad agrícola y la reducción de pérdidas por plagas y enfermedades. Por ejemplo, cultivos como el maíz Bt y el algodón Bt han sido modificados para producir toxinas que son letales para ciertos insectos, reduciendo así la necesidad de los pesticidas químicos y promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles (Kumar *et al.*, 2020). Además, estos cultivos pueden ser diseñados para ser resistentes a herbicidas, lo que facilita el control de malezas y mejora el rendimiento agrícola.

Las aplicaciones de los OGM también pueden ir dirigidos a obtener mejoras nutricionales significativas. Un ejemplo destacado es el arroz dorado, que se modificó para producir betacaroteno, un precursor de la vitamina A, con el objetivo de combatir la deficiencia de esta vitamina en regiones donde el arroz es un alimento básico en la dieta (Kumar *et al.*, 2020), reduciendo así la incidencia de ceguera infantil y mejorando la salud general (Paine *et al.*, 2005). Este tipo de mejoras no solo aborda problemas de salud pública, sino que también puede contribuir a la seguridad alimentaria global al hacer que los alimentos sean más nutritivos y accesibles en países menos desarrollados.

El factor más limitante para el cultivo y comercialización de OGM en la Unión Europea es la legislación, una de las más estrictas a nivel mundial. La Unión Europea aplica el principio de precaución, lo que significa que solo aquellos OGM que han pasado rigurosas evaluaciones de seguridad y han sido autorizados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) pueden ser comercializados.

Los cultivos transgénicos permitidos para consumo humano o elaboración de piensos en la UE actualmente, junto con sus características mejoradas, se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. *Cultivos transgénicos permitidos para consumo humano o elaboración de piensos en la UE (elaboración propia a partir de los datos del Registro de la UE de OGM autorizados, 2024).*

CULTIVO	CEPA	RESISTENCIA	TOLERANCIA
MAÍZ	MON810	Insectos	
	Bt11	Insectos	Herbicidas
	NK603		Herbicidas
	MON863	Insectos	
	1507	Insectos	Herbicidas
SOJA	GTS40-3-2		Herbicidas
	MON89788		Herbicidas
ALGODÓN	MON1445		Herbicidas
	MON15985	Insectos	Herbicidas
COLZA	GT73		Herbicidas
	Ms8, Rf3		Herbicidas
REMOLACHA AZUCARERA	H7-1		Herbicidas

Estos OGM están registrados en el Registro Comunitario de Alimentos y Piensos Modificados Genéticamente (EU Register Of Authorised GMOs, s. f.), administrado por la Comisión Europea.

Ante una regulación tan estricta, se están explorando nuevas vías alternativas de introducción de material genético en plantas que no supongan una modificación permanente de su ADN.

1.3.INTRODUCCIÓN EXÓGENA DE ARN MENSAJERO: UNA ALTERNATIVA A LOS OGM

Con el fin de facilitar su aprobación en Europa y su cultivo, se están planteando diversas estrategias que permiten la producción temporal de proteínas específicas de interés dentro de la planta, pero que no impliquen la modificación permanente del ADN. De este modo, las plantas modificadas no se encontrarían sujetas a las mismas regulaciones que los OGM, y sería más sencillo su cultivo y su comercialización.

Una de estas estrategias es la introducción de ARN mensajero (ARNm) a través de las raíces, mediante un cultivo en hidroponía con las moléculas de ARNm presentes en la solución hidropónica.

La hidroponía es un método de cultivo de plantas que emplea una solución nutritiva en lugar de un sustrato sólido o suelo. Se trata de una alternativa innovadora y sostenible para la agricultura, teniendo en cuenta el actual aumento de la población y la disminución de las superficies de tierras cultivables (Jiffy Group E, s.f.). Además, esta técnica permite un mayor control sobre los nutrientes disponibles para las plantas y las condiciones de su entorno (Nguyen *et al.*, 2016). Frente a la agricultura convencional, la hidroponía puede suponer entre un 10 y un 25% de reducción de la tierra cultivable necesaria, una reducción del 33% en el consumo de agua, y una tasa de crecimiento entre un 30 y un 50% más rápidas (Pomoni *et al.*, 2023). Este ahorro de agua se debe a la posibilidad de recircularla y reutilizarla, disminuyendo así las pérdidas por evaporación y filtración.

1.4.ANTECEDENTES

Entre los casos de éxito de la incorporación de ARN exógeno a través de la superficie vegetal, destaca el presentado por Konakalla *et al.* en 2016, en el que se administró de forma exógena el ARN, en este caso ARN bicatenario de los genes *p126* y *CP* del virus de mosaico del tabaco (TMV) sobre hojas de las plantas infectadas por TMV. Tras el tiempo de incubación, se analizó la carga viral de las plantas tratadas y sus respectivos controles. Las plantas tratadas presentaron menos carga viral que las no tratadas, como consecuencia de una toma exógena de ARN, lo que desencadenó la activación del mecanismo de defensa vírica del ARN interferente.

Dalakouras *et al.* (2018) demostraron que las plantas también pueden absorber ARN a través de heridas, como refleja su estudio, en que se aplicó exitosamente ARN sobre la

superficie de hojas dañadas, y posteriormente se extrajo el ARN total de las hojas y se comprobó la presencia del ARN aplicado.

H. Li *et al.* (2015) pusieron a prueba la absorción, a través de las raíces, de ARN de doble cadena (dsARN) marcado con proteína fluorescente amarilla (dsEYFP). Para ello, sumergieron raíces de plantas de arroz durante 24 horas en una solución que contenía dsEYFP, y posteriormente observaron fluorescencia tanto en los tallos de la planta, como en las chicharritas pardas que se alimentaron del arroz 24 horas después de la inmersión de las raíces. Demostraron así que remojar las raíces de arroz en ARN bicatenario podría proteger contra ciertas plagas.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar una metodología que permita producir proteínas de interés en plantas sin necesidad de obtener una planta transgénica.

Según la hipótesis de este trabajo, el ARNm absorbido podría ser incorporado por las células de la raíz y transportado sistémicamente a otras partes de la planta donde se traduciría en proteínas de interés.

Para comprobarlo, se generó el ARN mensajero del gen *YFP* (*Yellow Fluorescence Protein*), cuya traducción da lugar a una proteína fluorescente (YFP) de fácil visualización y seguimiento mediante técnicas de microscopía, y se introdujo en la planta tomate de variedad RAF (*Resistant Against Fusarium*), cuya genética ha sido ampliamente estudiada y es fácil de cultivar, lo que la convierte en una excelente planta modelo para la experimentación. Por último, se hicieron cortes de distintos tejidos que fueron observados bajo microscopio confocal para comprobar la traducción del ARN introducido.

En este contexto, hemos abordado los siguientes objetivos parciales:

- 1) Clonar el gen *YFP* en células de *Escherichia coli*.
- 2) Obtener ARN mensajero del gen *YFP* mediante transcripción *in vitro*.
- 3) Introducir el ARN mensajero del gen *YFP* y verificar su traducción en los tejidos del tomate, utilizando microscopía láser confocal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En primer lugar, y para una mejor comprensión del trabajo realizado, se presenta un diagrama de los pasos seguidos durante el desarrollo de este trabajo (Figura 1).

El desarrollo de este trabajo se agrupa en 2 grandes etapas:

- **Obtención de ARN mensajero (ARNm) de YFP:** el gen *YFP* se obtuvo de un plásmido de una cepa modificada genéticamente de la bacteria *Bacillus subtilis* (*pYFP*). Para obtener grandes cantidades de este gen, fue necesario cultivar la cepa, extraer el plásmido de la bacteria y amplificarlo mediante PCR con oligonucleótidos previamente diseñados de forma selectiva para el gen de interés (*YFP*). A continuación, se ligó el gen a otro plásmido vector, el pT7, que contiene el promotor T7 aguas arriba de una región *polylinker* en la que se insertó, para su expresión el marco de lectura abierto del gen *YFP* amplificado previamente mediante PCR. Este plásmido modificado que hemos denominado pT7:YFP en la bacteria *Escherichia coli*. Se cultivó la cepa anteriormente descrita de *E. coli* para conseguir más copias del plásmido con el gen de interés, y se linearizó el plásmido para poder transcribirlo *in vitro* a ARN mensajero. Previamente, se secuenció el plásmido para comprobar la correcta inserción del gen.
- **Incorporación de ARNm exógeno a las plantas de tomate:** para incorporar el ARNm a las plantas se utilizaron plántulas de tomate, obtenidas mediante la germinación de las semillas en vermiculita; las plántulas se incubaron en hidroponía con el ARNm incorporado a la solución acuosa, y, tras 24 horas de contacto, se observaron distintos cortes de estas plántulas en un microscopio confocal con fluorescencia, para comprobar si traducía el gen *YFP*, y por tanto podía observarse la emisión de fluorescencia producida por la proteína YFP.

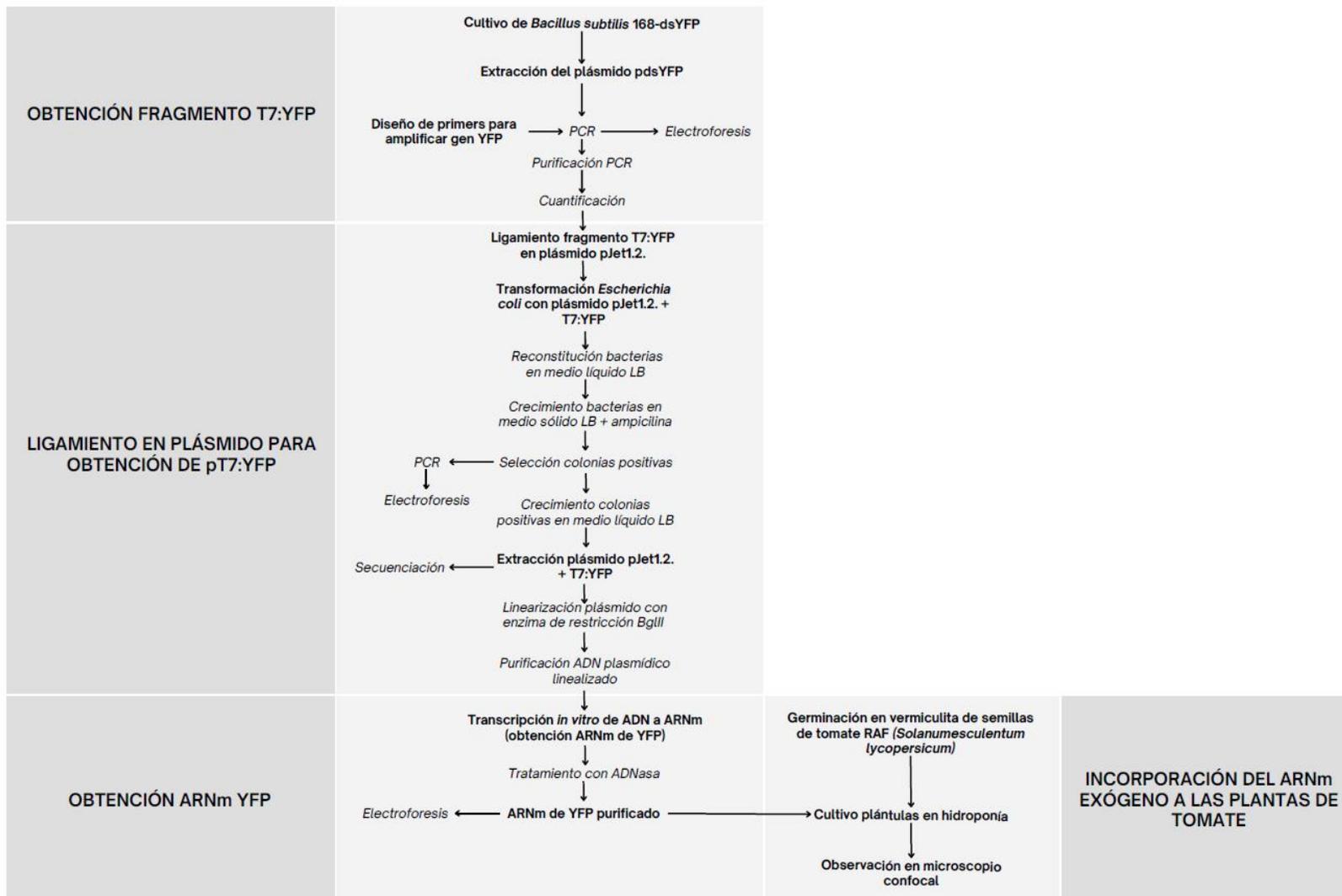


Figura 1. Diagrama de flujo del trabajo.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO

3.1.1. *Bacillus subtilis*

Para la obtención del plásmido pdsYFP se empleó la cepa de *B. subtilis* 168-dsYFP, modificada genéticamente a partir de la cepa silvestre *B. subtilis* 168. El plásmido pYFP (Figura 2) contiene el gen *YFP*, que codifica para la proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescence Protein*). Además, contiene un gen de resistencia a la ampicilina, lo que permitió seleccionar a las bacterias que habían incorporado el plásmido.

3.1.2. *Escherichia coli*

Se empleó la cepa comercial TOP10 de *E. coli* (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) para clonar el plásmido pT7:YFP, construido a partir del plásmido comercial pJet1.2. con el gen *YFP*, bajo el control del promotor T7. Se introdujo el plásmido en la bacteria, mediante transformación de células competentes y estas se cultivaron para obtener más copias del plásmido.

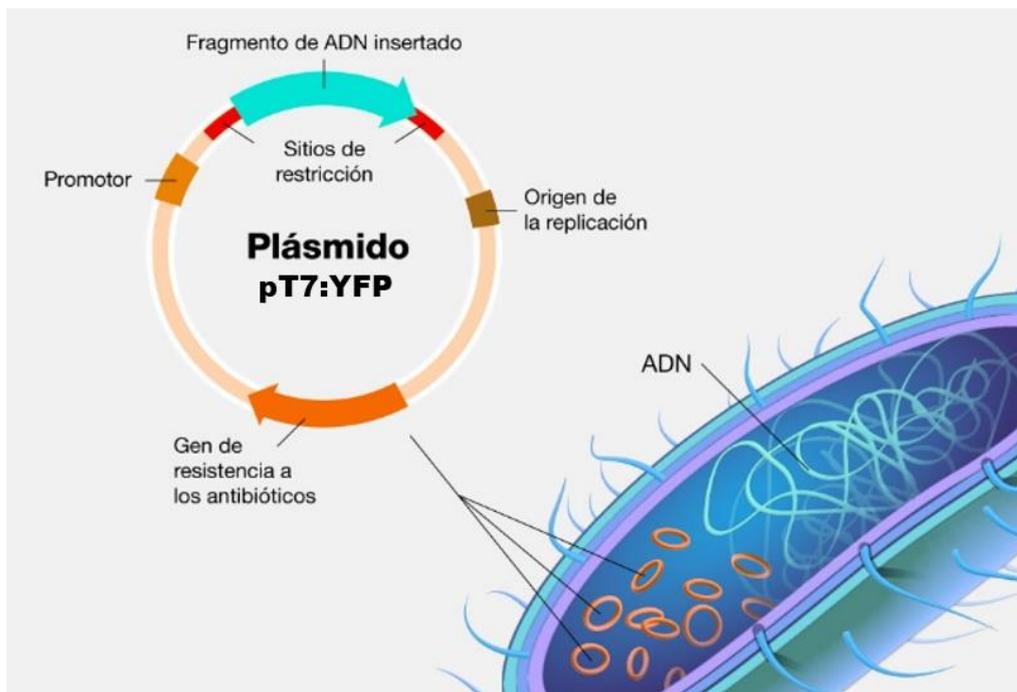


Figura 2. Esquema de las células de la bacteria *Escherichia coli* transformada con el plásmido pT7:YFP, construido en este trabajo.

3.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO BACTERIANO

El medio de cultivo empleado para el crecimiento bacteriano tanto de *B. subtilis* como de *E. coli* fue LB (Lysogeny Broth). En ambos casos, se emplearon 10 mL de medio líquido, que se incubaron en agitación a 250 rpm, durante 16 horas, a 30°C en el caso de *B. subtilis* y a 37°C en el caso de *E. coli*.

La composición del medio LB fue 0,5% NaCl, extracto de levadura 0,55%, peptona de caseína 1%. Cuando fue necesario se añadió el antibiótico ampicilina a razón de 100 µg/mL.

El medio sólido tenía la misma composición que el medio líquido, al que se le añadieron 15 g/L de agar bacteriológico. Las placas de Petri inoculadas se incubaron 16 horas a 37°C.

3.3. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Los plásmidos de interés se extrajeron siguiendo el protocolo de purificación de plásmidos “Isolation of high-copy plasmid ADN from *E. coli* (Nucleospin® Plasmid/Plasmid (NoLid) protocols” (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), adaptado para bacterias gram + en el caso de *B. subtilis*.

Tras el cultivo bacteriano, se utilizaron los procedimientos y reactivos descritos por el fabricante y contenidos en el kit, siguiendo los siguientes pasos:

- 1. Sedimentación de bacterias:** se centrifugaron 2 mL de cultivo bacteriano líquido, durante 30 segundos, a 11000 x g. Se desechó el sobrenadante, eliminando así todo el medio de cultivo posible.
- 2. Lisis celular:** se añadieron 250 µL del Buffer A1 (lisis), y se resuspendió el precipitado de células empleando un Vórtex. El protocolo está originalmente diseñado para bacterias gram – como *E. coli*, así que para *B. subtilis* (*gram +*) se modificó ligeramente. *B. subtilis* presenta una capa más gruesa de pared celular, compuesta por peptidoglicano, lo que dificulta la lisis celular únicamente mediante la acción del detergente incluido en el Buffer A1 (lisis). Por esta razón, para extraer los plásmidos de *B. subtilis*, se aplicó calor (60°C) y se aumentó el tiempo de incubación a 10 minutos. A continuación, se añadieron 250 µL del Buffer A2, y se incubó a Tª ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se

adicionaron 300 μ L del Buffer A3 (neutralización) y se mezcló invirtiendo los tubos suavemente.

- 3. Clarificación del lisado:** se centrifugó durante 5 minutos a 11000 x g, a temperatura ambiente para eliminar los residuos celulares.
- 4. Unión del ADN a la membrana de sílice/columna:** se colocó una columna de filtración del kit en un tubo colector y se pipeteó el sobrenadante obtenido de la clarificación, con precaución de evitar el precipitado. Se centrifugó durante 1 minuto a 11000 x g, y se descartó el líquido recogido en el tubo colector.
- 5. Lavado de la membrana de sílice:** se añadieron 600 μ L del Buffer A4 (tampón de lavado), suplementado con etanol, según se indica en el protocolo del kit y se centrifugó durante 1 minuto a 11000 x g, descartando de nuevo el líquido recogido en el tubo colector.
- 6. Secado de la membrana de sílice:** se centrifugó durante 2 minutos a 11000 x g, y se desechó el tubo colector.
- 7. Elución del ADN:** se colocó la columna con el ADN retenido en la membrana en un microtubo de centrífuga, y se añadieron 50 μ L de agua Milli-Q® autoclavada. El protocolo convencional dicta eluir con Buffer AE, pero para evitar interacciones en otros procesos, y dado que también permite una elución eficiente, se decidió emplear agua en este paso. Se centrifugó durante 1 minuto a 11000 x g, y se conservó el producto de la elución a 4°C hasta su utilización.

3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica empleada para amplificar secuencias de ADN. En ella, se utilizan cebadores (secuencias cortas de nucleótidos) para iniciar, de forma selectiva, el copiado de la parte del genoma que se quiere amplificar y se aplican sucesivamente temperaturas específicas para la desnaturalización, hibridación y replicación del ADN diana, que se repiten una serie de veces para obtener suficientes copias de este. En nuestro caso las temperaturas empleadas fueron de 98, 60 y 72°C, respectivamente y el número de ciclos fue de 40, tal como se describe en la Tabla 3.

En este trabajo se realizaron PCRs tanto sobre ADN purificado como sobre colonias bacterianas.

Tabla 3. Programa de amplificación por PCR.

Temperatura (°C)		Tiempo (min:s)	
98	Desnaturalización inicial	0:30	
98	Desnaturalización cíclica	0:10	
60	Hibridación	0:35	x40 ciclos
72	Extensión	0:30	
72	Extensión final	7:00	
12	Conservación	Indeterminado	

Una vez obtenido el producto amplificado de la PCR (amplicón), este se almacenó a 4°C.

Para que la reacción en cadena de la polimerasa tenga lugar, son necesarios distintos compuestos: nucleótidos (dNTPs), que serán las piezas que conformen las nuevas hebras de ADN sintetizadas; iniciadores F (*forward*) y R (*reverse*), que delimitan la región de ADN a copiar; una polimerasa encargada de llevar a cabo la síntesis del ADN que queremos amplificar, con su correspondiente tampón; y agua hasta completar el volumen de reacción. En este trabajo se empleó la polimerasa de alta fidelidad “Phusion High-Fidelity ADN Polymerase” que deja extremos romos en el amplicón.

Las proporciones de cada compuesto están recogidas en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción de PCR realizada para amplificar el plásmido purificado de *Bacillus*.

Compuesto	Volumen (µL)	Concentración final
Agua	15,75	0,63 µL/ µL
5x Bbuffer(5x? 10x?)	5	0,2 µL/ µL
dNTPs (10 mM)	0,5	0,2 mM
Iniciador F (10 µM)	1,25	0,2 µM
Iniciador R (10 µM)	1,25	0,2 µM
Polimerasa (30 U/µL)	0,25	0,3 U/µL
ADN molde	1	0,04 µL/ µL

2.5. ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica que permite separar moléculas en función de su tamaño y de su carga eléctrica (Figura 3). Se coloca en el equipo un gel o matriz similar, que actúa como un tamiz, sumergido en un tampón. Se aplica una corriente eléctrica que hace migrar las moléculas hacia el polo opuesto del gel, a través de los poros, de modo que las moléculas más pequeñas se desplazan a mayor velocidad, y viceversa. Se separa en el mismo gel un marcador (conjunto de moléculas de tamaño conocido), que permite deducir el tamaño de las bandas de la muestra.

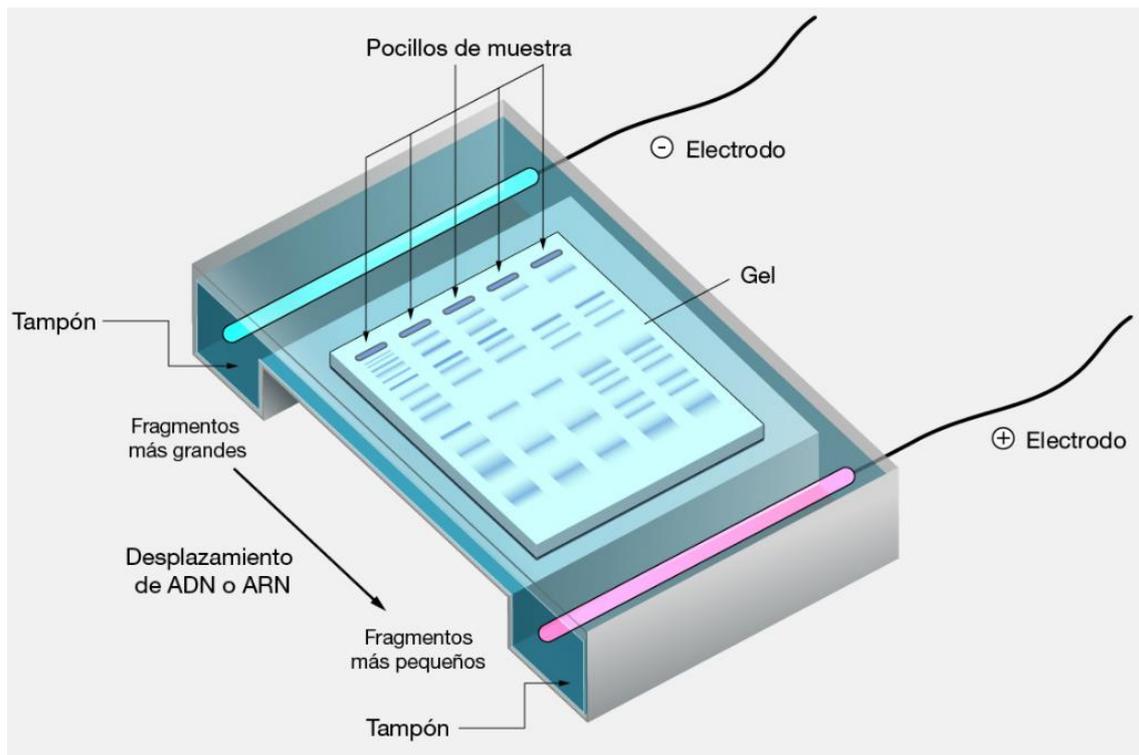


Figura 3. Esquema de un equipo de electroforesis con un gel de agarosa.

En este trabajo, se utilizaron geles de agarosa al 1% en TAE. En nuestro caso, preparamos el gel fundiendo en el microondas 1 g de agarosa en 100 mL de TAE [Tris acetato 0,4 M (pH 8,3); EDTA 0,01 M]. A continuación, se añadieron 5 μ L de GreenSafe Premium (NZYTech, Lisboa, Portugal). Se dejó enfriar el contenido del matraz a temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura de unos 60°C, y se vertió el líquido en un molde para geles de agarosa, dotado de un peine para formar los pocillos donde se introducirán las muestras y los marcadores. Este peine se retiró cuidadosamente una vez solidificado el gel.

En las electroforesis realizadas en este trabajo, se utilizó el marcador de tamaño molecular FastGene 1 kb DNA Marker Plus (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Alemania). A las muestras insertadas en los pocillos, se les añadió un tampón de carga que contenía glicerol y azul de bromofenol para asegurar la permanencia de la muestra en el pocillo y el seguimiento de su carrera.

2.6. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La cuantificación de ácidos nucleicos se hizo empleando un fluorímetro Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). La medida se basa en la unión de los ácidos nucleicos de la muestra con los fluorocromos del kit, de forma que se puede distinguir el ADN bicatenario del monocatenario, y el ARN intacto del degradado, incluso en cantidades muy pequeñas o en presencia de contaminantes, y cuantificarlos. El kit empleado para medir la concentración de ADN en la muestra fue “Kit de ensayo de alta sensibilidad (HS) de ADNds Qubit™ 1X”.

2.7. LIGAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO pT7:YFP

El ligamiento entre el ADN purificado y el plásmido vector pJet1.2, se realizó siguiendo el protocolo “CloneJET PCR Cloning Kit (Blunt-End Cloning protocol)” (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Este protocolo permite ligar extremos romos, que son los extremos que deja la enzima Phusion High-Fidelity ADN Polymerase, empleada en la PCR para amplificar el gen *YFP*.

La preparación de la mezcla de ligamiento se llevó a cabo en un Eppendorf colocado sobre hielo. La composición de la mezcla fue: 10 µL de buffer de reacción, 1 µL de producto de PCR (obtenido del apartado 3.4.), 1 µL del vector de clonación pJET1.2, 7 µL de agua comercial libre de nucleasas, y 1 µL de ADN ligasa T4. La mezcla se agitó con ayuda de un vórtex durante 5 segundos. Finalmente, la preparación se incubó a 16°C toda la noche.

2.8. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Para la transformación bacteriana se emplearon células competentes de *Escherichia coli* Top 10 y el plásmido recombinante obtenido en el apartado 2.7.

1. **Incubación** (30 minutos en hielo). Se mezclaron en un tubo Eppendorf 10 µL de producto de ligamiento y 50 µL de células competentes de *E. coli*, y se incubaron durante 30 minutos sobre hielo.
2. **Choque térmico** (1 minuto a 42°C y 2 minutos en hielo). Se preparó un baño a 42°C, y se introdujeron los tubos Eppendorf durante 1 minuto. Rápidamente se pasaron los dos tubos a una caja con hielo, y se incubaron durante 2 minutos.

3. **Incubación en medio LB.** Se añadieron 450 μL de medio líquido LB, y se incubaron los tubos a 37°C durante a 250 r.p.m. durante 1,5 horas. Este paso permite la expresión del gen de resistencia a ampicilina en las células transformadas.
4. **Incubación en medio sólido LB + ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.** Las células del paso anterior se transfirieron a una placa de medio LB -agar y se incubaron las a 37°C durante 16 horas. La adición de ampicilina impidió la supervivencia de las bacterias que no hubieran incorporado el plásmido de interés.

2.9. LINEARIZACIÓN DEL PLÁSMIDO EXTRAÍDO

El plásmido se aisló de las bacterias del anterior siguiendo el mismo protocolo que en el punto 3.3.

Una vez extraído, se trató con el enzima *Bgl*III (New England Biolabs) como sigue: se incubaron 5 μg del plásmido extraído con 50 unidades del enzima, 5 μL del tampón correspondiente (1X NEBuffer™ r3.1) en 50 μL de volumen final un baño a 37°C durante 1 hora con el fin de linearizar el plásmido.

2.10. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para eliminar la enzima de restricción *Bgl*III empleada en la linearización, se empleó el kit “Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit”, de la marca Macherey-Nagel.

Este procedimiento permite aislar el ADN del resto de componentes de las distintas reacciones enzimáticas. En este proyecto, dicho procedimiento se llevó a cabo en diversas ocasiones para aislar el amplicón de PCR, después del proceso de ligación, y después de la transcripción.

Este protocolo se siguió tal y como indican sus instrucciones:

1. **Ajuste de las condiciones de unión del ADN:** se mezclaron en un tubo Eppendorf una parte de muestra y dos de buffer NTI.
2. **Unión del ADN:** se colocó una de las columnas de cromatografía del kit sobre un tubo colector de 2 mL, y se cargaron 700 μL de la mezcla anterior en esta columna. Se centrifugó durante 30 segundos a 11000 x g y se descartó el eluato del tubo colector. Se volvió a colocar la columna sobre el tubo colector.

3. **Lavado de la membrana de sílice:** se añadieron 700 μL del buffer NT3 a la columna, se centrifugó durante 30 segundos a 11000 x g y se descartó el eluato del tubo colector. Se volvió a colocar la columna sobre el tubo colector.
4. **Secado de la membrana de sílice:** se centrifugó durante 1 minuto a 11000 x g la columna sobre el tubo colector, para eliminar completamente los restos de buffer NT3. Se descartó el tubo colector con el eluato.
5. **Elución del ADN purificado:** se colocó la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, y se añadieron 10-30 μL de agua Milli-Q[®] autoclavada. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto, y transcurrido este tiempo se centrifugó durante 1 minuto a 11000 x g. Se conservó el eluato.

2.11. TRANSCRIPCIÓN DE ADN A ARN

Para transcribir el ADN a ARNm se empleó la enzima T7 ARN polimerasa (Thermo Fisher), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y siguiendo los siguientes pasos:

1. Composición de la mezcla de reacción: los reactivos utilizados, las concentraciones iniciales y finales y el volumen de cada uno empleado para cada reacción (50 μL) se recoge en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de la reacción de transcripción de ADN a ARN (Thermo Fischer).

Compuesto	Volumen (μL)	Concentración final
5x buffer de transcripción	10	0,2 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$
ATP/GTP/CTP/UTP Mix, 10 mM cada	10	2 mM
ADN linearizado (10 μg)	1	0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor (50 U/ μL)	1,25 (50 U)	1,25 U/ μL
ARN polimerasa T7 (30 U/ μL)	30 U	0,6 U/ μL
Agua tratada DEPC	Hasta 50	

2. Incubación a 37°C durante 4 horas.
3. Al producto obtenido de la transcripción, se le aplicó un tratamiento con 2 μL (2 U) de ADNasa, para degradar el ADN molde. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 37°C, de modo que no interfiriese en las posteriores transformaciones ni en el peso molecular de las pruebas de verificación.
4. Inactivación de la ADNasa mediante extracción con fenol/cloroformo (50:50).

2.12. CULTIVO DE PLANTAS DE TOMATE

2.12.1. MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal se emplearon semillas de tomate *Solanum lycopersicum* de la variedad RAF (Rocalba).

2.12.2. GERMINACIÓN EN VERMICULITA

Se pusieron a germinar las semillas en una bandeja con vermiculita (material inerte y con alta capacidad de retención de agua) húmeda durante 7 días a 21,5°C, con un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas en oscuridad.

2.12.3. CULTIVO EN HIDROPONÍA

Una vez germinadas las semillas, las plántulas se pasaron de la vermiculita a un tubo "Falcon" de 50 mL, y se cultivaron durante 16 horas en 50 mL de agua estéril con el ARNm obtenido en el apartado 3.11. Los tubos se recubrieron con papel de aluminio, para proteger el contenido de la luz.

2.13. MICROSCOPIA

Se llevaron a cabo cortes longitudinales de las hojas y transversales de los tallos para ser observados en un microscopio confocal con fluorescencia.

Para el análisis CLSM (*confocal laser scanning microscopy*), o microscopía confocal, las hojas de las plantas de tomate se lavaron en agua destilada estéril. Se cortaron manualmente con una cuchilla secciones transversales de la planta y muestras longitudinales de 1 mm de grosor. Las muestras se colocaron en un portaobjetos sumergidas en glicerol 50% (V/V). El análisis microscópico se llevó a cabo usando un microscopio confocal de barrido láser espectral (TC S2-SP8, Leica Microsystems). La excitación fue proporcionada por un láser de argón (488 nm). La fluorescencia de la proteína YFP se detectó en el espectro comprendido entre 520 y 560 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN DEL GEN *YFP*

Se construyó el plásmido pT7:YFP a partir del plásmido comercial pJet1.2., que permitió la inserción del gen *YFP* bajo el control del promotor T7. El plásmido pJet1.2. es un vector que contiene el gen de resistencia a ampicilina, lo cual permite la selección positiva de las bacterias transformadas.

El primer T7-YFP F, se diseñó de la siguiente forma: la secuencia del promotor T7 se unió a una secuencia ampliamente empleada por otros investigadores que se ubicó por delante (*upstream*) a la secuencia de interés, ya que se estableció la hipótesis de que mejoraría y facilitaría la traducción de la secuencia de interés de este estudio (a esta región se uniría el ribosoma); y por último la secuencia inicial del gen YFP (inicio en “ATG”).

- Secuencia primer T7-YFP F (*forward* →): 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC TAC CGG TCG CCA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AGG AGC – 3'

Para el diseño del primer T7-YFP R, se emplearon la secuencia reversa complementaria del final del terminador de T7 y la secuencia reversa complementaria de los últimos 25 nucleótidos del gen YFP (se seleccionaron 25 para ajustar el tamaño del primer a 60 pares de bases).

- Secuencia primer T7-YFP R (*reverse* ←): 5' – CCC TCA AGA CCC GTT TAG AGG CCC CAA GGG GTT ATC TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG CCG – 3'

Para validar estas secuencias se establecieron 3 parámetros: T^a de desnaturalización superior a 60°C, proporción de G+C/A+T (45-60%) suficiente para asegurar la especificidad, y ausencia de secuencias complementarias para evitar la hibridación entre plásmidos.

Para diseñar estas secuencias, se tuvo en cuenta la relación porcentual de C+G/A+T. Un porcentaje alto facilita una mejor especificidad de la transcripción, ya que se requiere una mayor temperatura de desnaturalización para las parejas GC que para las parejas AT. De esta forma, conseguimos temperaturas de anillamiento superiores a 60°C.

Una vez introducido en el vector, se identificó el fragmento de ADN correspondiente al gen *YFP*, regulado por el promotor T7 y el terminador T7, realizando la electroforesis

cuyo resultado se muestra en la Figura 4. En esta electroforesis, la muestra empleada fue el plásmido purificado de *Bacillus*.

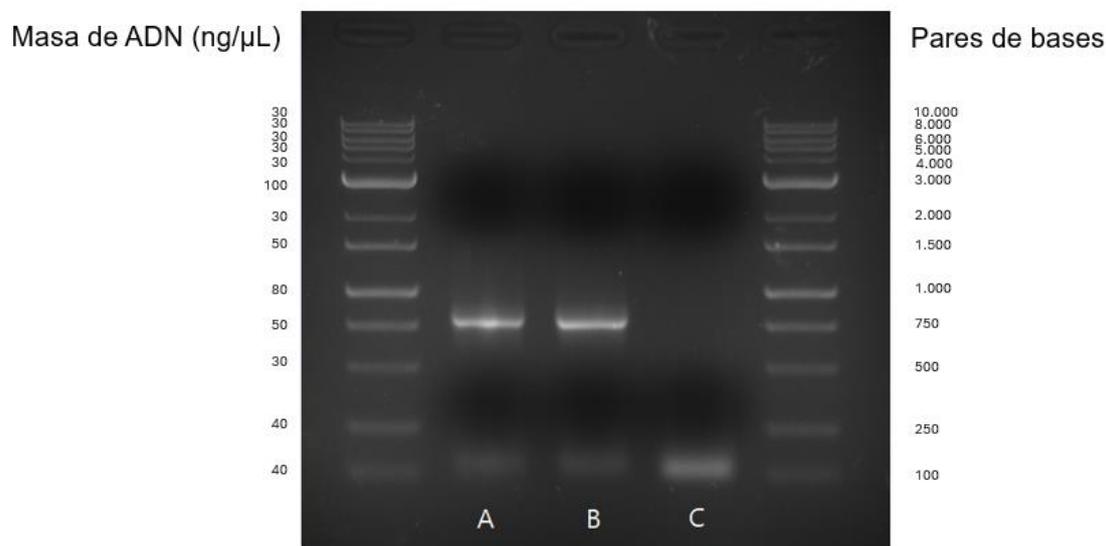


Figura 4. A: control positivo. B: muestra. C: control negativo.

La banda observada en los pocillos A (control positivo) y B (muestra) del gel de agarosa presentaron al mismo tamaño, de unas 800 pb. Este resultado indica que el amplicón obtenido corresponde al fragmento de YFP junto con las secuencias del promotor y del terminador añadidos.

3.6. CLONACIÓN DEL GEN *YFP* EN *Escherichia coli*

El crecimiento de las colonias fue doblemente selectivo, tal como se indica en la Tabla 7. Por un lado, tal como se recoge en la Figura 2 (página 9) el plásmido contiene el gen de resistencia a la ampicilina. De esta manera, al añadir ampicilina al medio de cultivo, se impide el crecimiento de cualquier bacteria que no haya incorporado el plásmido vector.

Por otro lado, el plásmido contiene el gen *eco47IR*, cuya expresión da lugar a la muerte de las bacterias que lo contengan. Sin embargo, tal como se refleja en la Figura 2, este gen de letalidad contiene una secuencia diana para el enzima de restricción *Bgl*III que se usó para clonar el fragmento de interés, en nuestro caso, el gen *YFP*. De esta manera, si las bacterias transformadas integran el plásmido vacío, el gen de letalidad estaría intacto y las bacterias morirían; sin embargo, si se ha producido la inserción del fragmento de interés en el gen de letalidad, este quedaría inactivado (Fig.2, p9) permitiendo la viabilidad de las bacterias que lo integren. Combinando ambas características del plásmido, nos aseguramos de que todas las bacterias que generen colonias en el medio, hayan incorporado tanto el plásmido (y la resistencia a la

ampicilina), como el fragmento de interés, al tener interrumpido, y por consiguiente, desactivado, el gen de letalidad.

Tabla 6. Criterio de selección de bacterias transformadas.

	PLÁSMIDO	FRAGMENTO DE INTERÉS	RESULTADO
CASO 1	X	X	Muerte de la bacteria por su sensibilidad a la ampicilina
CASO 2	✓	X	Muerte de la bacteria por presencia del gen de letalidad <i>eco47IR</i> en el plásmido
CASO 3	✓	✓	Viabilidad de la bacteria por presencia de resistencia a la ampicilina e interrupción del gen de letalidad

Los resultados de la clonación se recogen en la Figura 5. Las colonias viables de las placas A y B tienen interrumpido el gen de letalidad, y presentan resistencia a la ampicilina, por lo que son positivas en incorporación de pT7:YFP. Las colonias viables de la placa C, correspondiente al control negativo, en el que el crecimiento de algunas colonias a veces es visible debido a la generación de cepas resistentes a ampicilina.

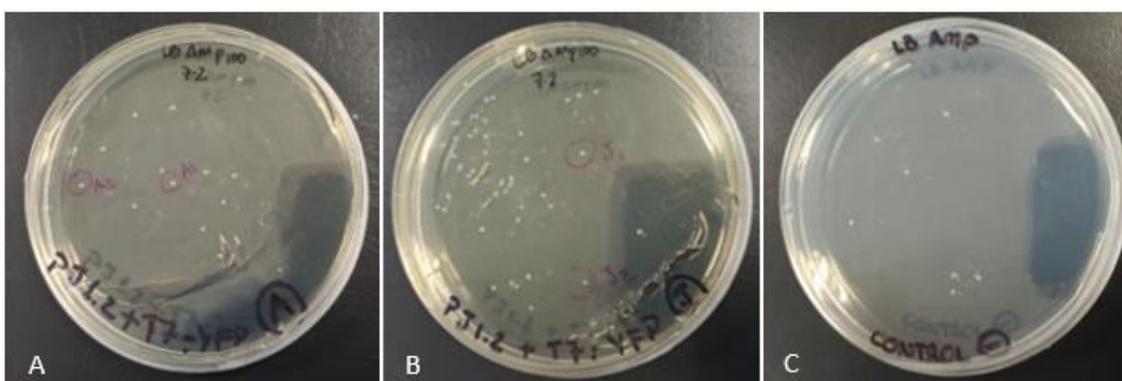


Figura 5. Placas de colonias de *Escherichia coli*. A y B: placas inoculadas con bacterias transformadas. C: control negativo. Sobre algunas colonias de las placas A y B se verificó la presencia del gen de interés mediante secuenciación posteriormente.

Para verificar que las bacterias de las colonias transformadas contenían el gen de interés, se llevó a cabo una amplificación por PCR de colonia. Para ello, se seleccionaron dos colonias positivas de la placa A (A4 y A5), dos colonias positivas de la placa B (B4 y B4), y se tomaron como control negativo dos colonias de la placa C (PJET A y PJET B). El resultado de la PCR se comprobó mediante una electroforesis que se presenta en la Figura 6.

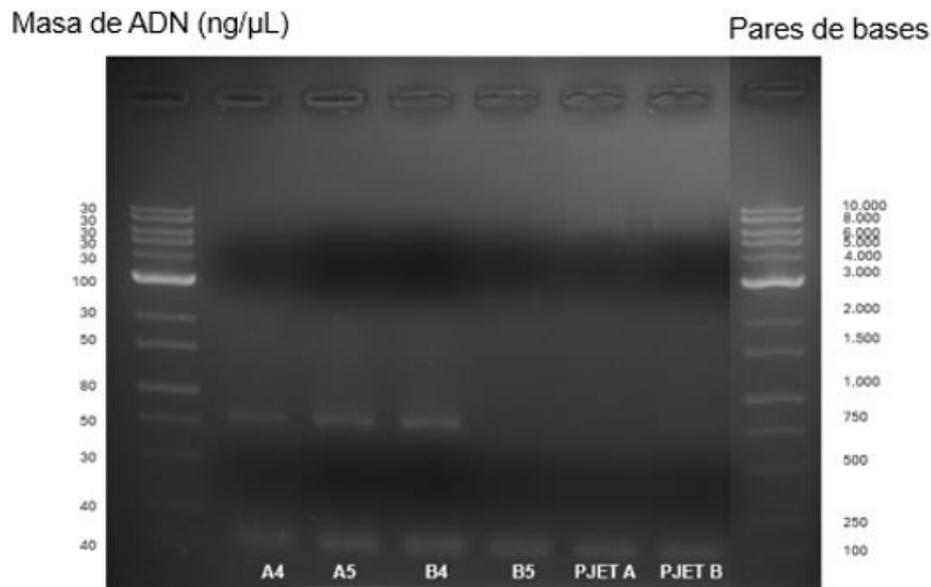


Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR a partir de las colonias A4, A5, B4, B5, PET A y PJET B.

Los productos de las colonias A4, A5 y B4 se esperaban positivos, es decir, con un tamaño de aproximadamente 750 pb, y así lo reveló la electroforesis. El producto de la colonia B5 no es visible en este gel, probablemente debido a una baja concentración de la muestra cargada en el pocillo correspondiente. Los productos de las colonias PJET A y PJET B se esperaban negativas, y así lo confirmó la electroforesis, dado que no se obtuvo banda a la altura del tamaño de pb del fragmento de interés.

Para confirmar que la secuencia del gen *YFP* no ha sufrido ningún cambio nucleotídico durante todo el proceso, se secuenció mediante tecnología Sanger en la empresa Stab vida.

En la Figura 7 se recogen las secuencias nucleotídicas del gen *YFP* y del producto de secuenciación es homóloga completamente, excepto en un nucleótido (46), debido a la baja resolución de la secuenciación en su inicio (propia de la tecnología Sanger), por lo que podemos concluir que el plásmido pT7:YFP incluye el gen de interés *YFP* con la secuencia nativa.

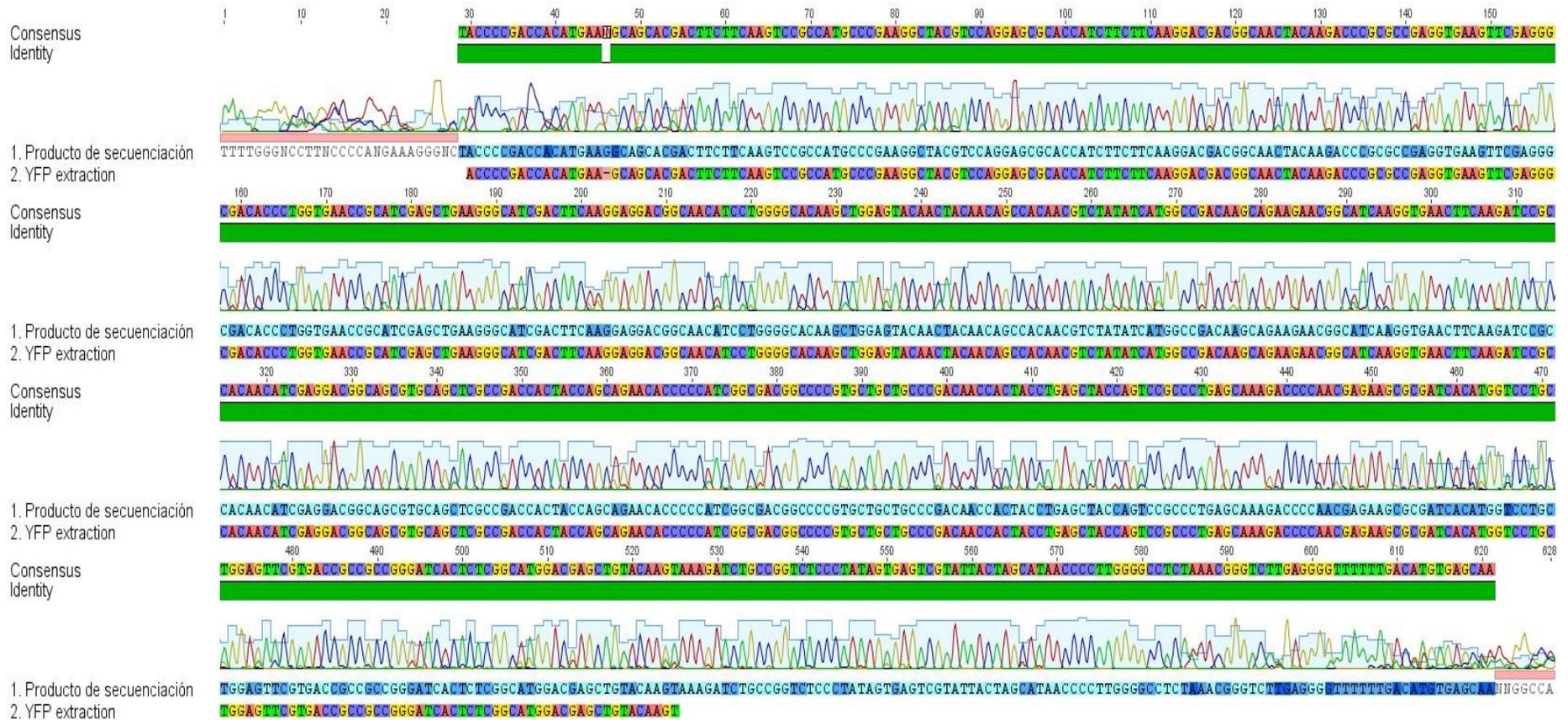


Figura 7. Alineamiento de las secuencias gen YPF original (YFP extraction) y del producto de secuenciación del plásmido T7:YFP. La barra verde indica homología para cada nucleótido entre las dos secuencias.

3.7. TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO* DEL GEN *YFP*

El gen *YFP* fue transcrito a partir del plásmido T7:*YFP in vitro*, tal como se indica en el apartado 2.11. de esta memoria, utilizando 77ng del plásmido linearizado (concentración estimada mediante Qubit, apartado 2.12 de esta memoria). A continuación, el ARNm obtenido fue tratado con ADNasa para degradar el ADN molde.

Para verificar la presencia del ARNm, se realizó una electroforesis que se recoge en la Figura 8. En la misma, se aprecia una única banda de unos 750 pb que corresponde con el tamaño del gen *YFP*.

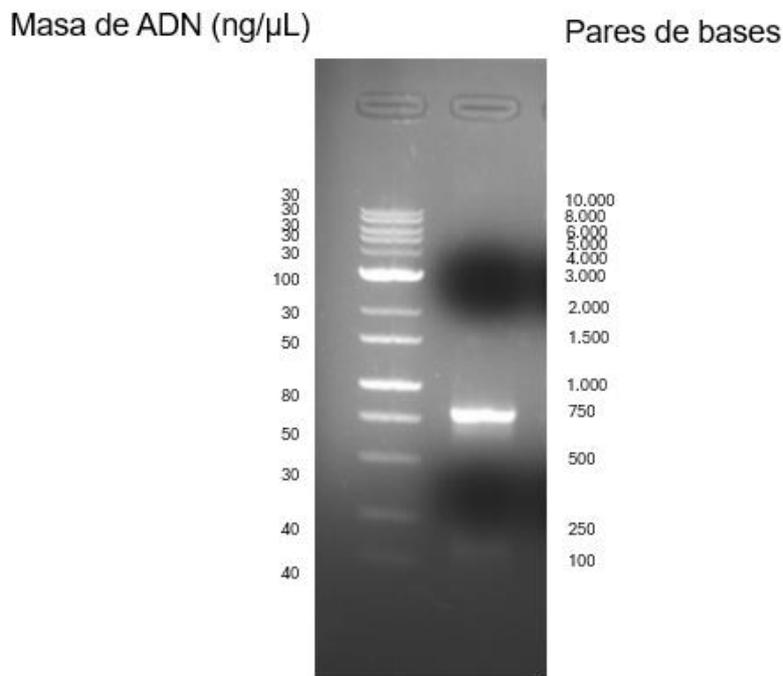


Figura 8. Electroforesis del ARN mensajero transcrito.

3.8. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA *YFP* POR LA PLANTA

Las semillas de tomate se pusieron a germinar en las condiciones descritas en el apartado 2.12.2. de este trabajo. Las plántulas obtenidas se incubaron con el ARNm del gen *YFP* según se describe en el apartado 2.12.3. Si la planta incorporase el ARNm del gen *YFP*, debería traducir la proteína correspondiente que emite fluorescencia bajo el microscopio.

La Figura 9 muestra las plántulas de tomate cultivadas en hidroponía. Tal como se detalla en el apartado 2.12., en la solución acuosa se añadió el ARNm del gen de la proteína fluorescente *YFP*, transcrito *in vitro* en los pasos anteriores.



Figura 9. Plántulas de tomate cultivadas en hidroponía con ARNm suspendido en la solución de cultivo.

Tras el periodo de incubación, se realizaron cortes transversales con una cuchilla en tallo y hojas, y fueron observados bajo el microscopio confocal. En la Figura 10 se muestran las imágenes del tallo y las hojas en las que se aprecia fluorescencia.

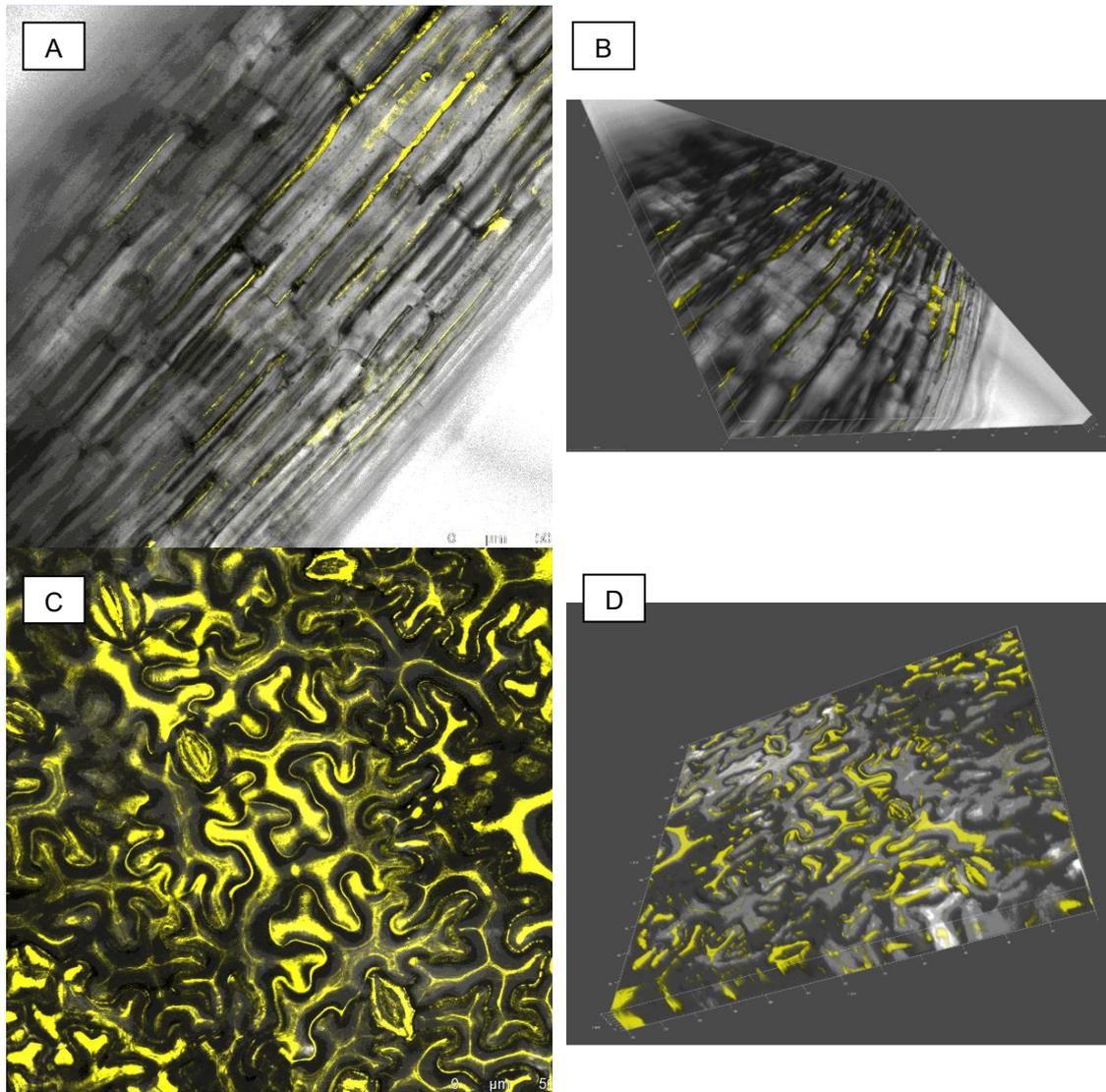


Figura 10. Imágenes obtenidas de microscopía confocal. A y B: tallo. C y D: hoja.

En este trabajo no se realizó un control negativo de microscopia de fluorescencia, dado que no se consideró la autofluorescencia de la propia planta. Este fenómeno puede ser generado por otras moléculas presentes en los tejidos vegetales, como la clorofila o la lignina. Aunque sus rangos de excitación son distintos a los de YFP, los de emisión podrían ser solapantes con la fluorescencia de nuestra molécula “chivata”, YFP, tal como se recoge en la Tabla 8.

Tabla 7. Rangos de emisión y excitación YFP, lignina y clorofila.

	Rango de excitación	Rango de emisión
YFP	490-515 nm (Silva <i>et al.</i> , 2023b)	520-560 nm (Silva <i>et al.</i> , 2023b)
Lignina	360 nm (Terry <i>et al.</i> , 2018)	440-550 nm (Terry <i>et al.</i> , 2018)
Clorofila	720-730 nm (Donaldson, 2020)	685 nm (Donaldson, 2020)

*luz azul, verde o UV

La distribución y abundancia de la fluorescencia detectada en los cortes analizados (Figura 10), parece indicar que, además de la fluorescencia debida a la incorporación de ARNm de YFP, existiría también autofluorescencia generada por los tejidos vegetales. No obstante, en ausencia de un control negativo y de más repeticiones, no puede asegurarse la procedencia de esta fluorescencia.

A la vista de estos resultados y para asegurar la efectividad de esta estrategia de forma más concluyente, sería interesante cambiar de marcador, por ejemplo, utilizando como moléculas fluorescentes GFP (excitación 488 nm y emisión 510 nm) (Thermo Fisher, s. f.), o proteína roja mCherry (excitación 587 nm, emisión 610 nm) (Lambert, s. f.).

4. CONCLUSIONES

Conclusiones específicas:

- La metodología utilizada en este trabajo para obtener ARN mensajero de la proteína fluorescente YFP utilizada como marcador, fue efectiva y eficaz, ya que la secuencia del ARNm secuenciado a partir de la expresión de la construcción fue prácticamente idéntica a la del gen original *YFP*.
- Las metodologías utilizadas para la introducción del ARNm en plantas, traslocación de forma sistémica a los distintos órganos de la planta, y traducción correspondiente en dichos órganos, no pudo ser verificada en este trabajo, puesto que no se consideró la autofluorescencia de los compuestos vegetales.
- Para asegurar el origen de la fluorescencia observada, se podría utilizar otra molécula fluorescente marcadora cuya longitud de onda de emisión no solapara con la de la autofluorescencia.

Conclusiones generales:

- No puede confirmarse ni descartarse la captación de ARN exógeno en este trabajo, debería hacerse otra prueba con un marcador que no sea detectable a la misma longitud de onda que la autofluorescencia de la pared vegetal.

5. BIBLIOGRAFÍA

- AESAN - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (s. f.). https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/omgs.htm
- Dalakouras, A., Jarausch, W., Buchholz, G., Bassler, A., Braun, M., Manthey, T., Krczal, G., & Wassenegger, M. (2018). Delivery of Hairpin RNAs and Small RNAs Into Woody and Herbaceous Plants by Trunk Injection and Petiole Absorption. *Frontiers In Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01253>
- Donaldson, L. (2020). Autofluorescence in Plants. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 25(10), 2393. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>
- EU Register of authorised GMOs. (s. f.). European Commission. Recuperado 2 de julio de 2024, de <https://webgate.ec.europa.eu/dyna2/gm-register/>
- Fang, T., Cao, H., Wang, Y., Gong, Y., & Wang, Z. (2023). Global Scientific Trends on Healthy Eating from 2002 to 2021: A Bibliometric and Visualized Analysis. *Nutrients*, 15(6), 1461. <https://doi.org/10.3390/nu15061461>
- Functional Foods Market Size, Share & Trends Analysis Report by ingredient (Carotenoids, prebiotics & probiotics, fatty acids, dietary fibers), by product, by application, by region, and segment Forecasts, 2022 - 2030.* (s. f.). <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/functional-food-market>
- Green Fluorescent Protein (GFP) | Thermo Fisher Scientific - IE.* (s. f.). <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/green-fluorescent-protein.html>
- Chofre, A. (2020, 8 enero). ¿Es lo mismo un organismo modificado genéticamente que un transgénico? Genotipia. <https://genotipia.com/es-lo-mismo-un-organismo-modificado-geneticamente-que-un-transgenico/>
- GMO register. (s. f.). Food Safety. https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms/gmo-register_en

Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatef, E., Linicus, L., Johannsmeier, J., Jelonek, L., Goesmann, A., Cardoza, V., McMillan, J., Mentzel, T., & Kogel, K. H. (2016). An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLOS Pathogens*, *12*(10), e1005901. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>

Konakalla, Carolina del Norte, Kaldis, A., Berbati, M. *et al.* La aplicación exógena de moléculas de ARN bicatenario de los genes TMV p126 y CP confiere resistencia contra TMV en el tabaco. *Planta* **244**, 961–969 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2567-6>

Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A. K., Singh, A., Jha, A. K., Yadava, P., Choudhary, M., & Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, *251*(4). <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8>

La estrategia europea De la Granja a la mesa (From Farm to Fork): cómo conseguir un sistema alimentario sostenible. (2022, 28 julio). Representación En España. https://spain.representation.ec.europa.eu/noticias-eventos/noticias-0/la-estrategia-europea-de-la-granja-la-mesa-farm-fork-como-conseguir-un-sistema-alimentario-2022-07-28_es

Lakna. (2018, 11 octubre). *What is the Difference Between Transgenic and Cisgenic.* Pediaa.Com. <https://pediaa.com/what-is-the-difference-between-transgenic-and-cisgenic/>

Lambert, T. (s. f.). *mCherry at FPbase.* FPbase. <https://www.fpbases.org/protein/mcherry/>

Li, H., Guan, R., Guo, H., & Miao, X. (2015). New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant, Cell & Environment/Plant, Cell And Environment*, *38*(11), 2277-2285. <https://doi.org/10.1111/pce.12546>

Mohidem, N. A., Hashim, N., Shamsudin, R., & Man, H. C. (2022). Rice for Food Security: Revisiting Its Production, Diversity, Rice Milling Process and Nutrient Content. *Agriculture*, *12*(6), 741. <https://doi.org/10.3390/agriculture12060741>

- Nguyen, N. T., McInturf, S. A., & Mendoza-Cózatl, D. G. (2016). Hydroponics: A Versatile System to Study Nutrient Allocation and Plant Responses to Nutrient Availability and Exposure to Toxic Elements. *Journal Of Visualized Experiments*, 113. <https://doi.org/10.3791/54317>
- Paine, J. A., Shipton, C. A., Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., Wright, S. Y., Hinchliffe, E., Adams, J. L., Silverstone, A. L., & Drake, R. (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*, 23(4), 482-487. <https://doi.org/10.1038/nbt1082>
- Pomoni, D. I., Koukou, M. K., Vrachopoulos, M. G., & Vasiliadis, L. (2023b). A Review of Hydroponics and Conventional Agriculture Based on Energy and Water Consumption, Environmental Impact, and Land Use. *Energies*, 16(4), 1690. <https://doi.org/10.3390/en16041690>
- Silva, F. D. A., Machado, J. P. B., & Reis, P. A. B. D. (2023b). Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) in Host–Virus Interactions. En *Methods in molecular biology* (pp. 211-223). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3485-1_15
- Singh, M., Saini, R. K., Singh, S., & Sharma, S. P. (2019). Potential of Integrating Biochar and Deficit Irrigation Strategies for Sustaining Vegetable Production in Water-limited Regions: A Review. *HortScience*, 54(11), 1872-1878. <https://doi.org/10.21273/hortsci14271-19>
- Sistemas Hidropónicos: tipos, diferencias y ventajas.* (s. f.). Jiffy Group ES. <https://jiffygroup.com/es/noticias/sistemas-hidroponicos-tipos-diferencias-y-ventajas/>
- Terryn, C., Paës, G., & Spriet, C. (2018). FRET-SLiM on native autofluorescence: a fast and reliable method to study interactions between fluorescent probes and lignin in plant cell wall. *Plant Methods*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0342-3>
- The Future of Food and Agriculture: Trends and Challenges |Policy Support and Governance| Food and Agriculture Organization of the United Nations.* (s. f.-c). <https://www.fao.org/policy-support/tools-and-publications/resources-details/en/c/472484/>
- UMD Assistant Professor Explores Nettle as a Functional Food to Help Prevent Obesity, Diabetes, and Guard Your Gut Immune System Health.* (s. f.). College Of

Agriculture & Natural Resources At UMD. <https://agmr.umd.edu/news/umd-assistant-professor-explores-nettle-functional-food-help-prevent-obesity-diabetes-and/>

United Nations. (s. f.). *Población | Naciones Unidas*. <https://www.un.org/es/global-issues/population>

Verma, V., Vishal, B., Kohli, A., & Kumar, P. P. (2021). Systems-based rice improvement approaches for sustainable food and nutritional security. *Plant Cell Reports*, 40(11), 2021-2036. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02790-6>