

Identificación de genes de normalizado en series circadianas en *Petunia x hybrida*

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TRABAJO FINAL DE GRADO

Felipe Pérez de los Cobos Arnao

Director: Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Codirectora: Marta Isabel Terry López



Agradecimientos

Agradecer a mi familia todo el apoyo que me ha dado, sin ellos no habría conseguido nada en esta vida.

A mis compañeros de carrera, por todos los buenos y malos momentos compartidos.

Y finalmente, y no por ello menos importante, a Marcos y Marta, por toda su ayuda en la elaboración de este trabajo.

Resumen

La expresión génica es el proceso mediante el cual la información contenida en el DNA de una célula se transforma en un producto útil para la misma, ya sea una proteína o RNA funcional. Todas las células de un mismo organismo contienen la misma información genética, es decir, tienen los mismos genes, pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo, sino que este proceso depende de varios factores, incluidos el tipo celular y el momento de desarrollo de la célula. Esto hace que poder cuantificar la expresión de un gen sea de vital importancia en cualquier laboratorio de biología molecular. Una de las técnicas más utilizadas para estudiar la expresión génica es la cuantificación relativa, comparando la expresión del gen de interés con los niveles de expresión de un gen conocido, también llamado control interno.

En teoría, un gen de normalizado o gen de referencia, es aquel que mantiene su expresión constante independientemente del tipo celular, del momento de desarrollo de la planta y de las condiciones del medio. Este tipo de genes se utilizan como control interno en los métodos de cuantificación relativa, ya que al mantener su expresión constante permiten una mayor precisión a la hora de determinar el nivel de expresión de otro gen por comparación. Sin embargo, la bibliografía demuestra que los genes de normalizado utilizados tradicionalmente pueden variar su expresión en condiciones de estrés, según el tejido estudiado, etc.

Debido a esto, cada vez es más común la identificación y validación de genes de normalizado, buscando aquellos candidatos que mantengan su expresión constante bajo las condiciones del experimento elegido.

Una RT-qPCR es una técnica potente y económica de cuantificación de la expresión génica. En este trabajo fin de grado se ha utilizado esta técnica para validar 7 genes comúnmente utilizados en *Petunia x hybrida* como genes de normalizado, estudiando su expresión en series circadianas, es decir, tomando varias muestras a lo largo de un periodo de 24 horas. En este sentido, *P. hybrida* es una planta modelo en la que se ha demostrado la influencia de los ritmos circadianos en la fotosíntesis y en la emisión floral de volátiles. Los ritmos circadianos son variaciones cíclicas de las variables biológicas de los organismos vivos, que se repiten con un periodo cercano a las 24 horas. Este trabajo fin de grado permitirá utilizar los genes identificados como genes de normalizado en futuros ensayos en los que se utilice la RT-qPCR para estudiar la expresión de genes que estén afectados por los ritmos circadianos.

Los genes estudiados han sido *Actin-11*, *Cyclophilin 2*, *Elongation factor 1 α* , *Gliceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase*, *Ribosomal protein S13*, *GTP-binding nuclear protein* y *Ubiquitin*, estudiándose su comportamiento tanto en pétalo como en hoja.

Los resultados obtenidos muestran que la mayoría de estos genes no son válidos para su uso como genes de normalizado, dependiendo su comportamiento del tejido en el que se estudia. En pétalo los genes óptimos son *Actin-11* y *Cyclophilin 2*, mientras que en hoja estos genes varían ligeramente su comportamiento, siendo *Elongation factor 1 α* y de nuevo *Actin-11* los más estables. Por tanto son estos genes los que se recomiendan para su uso en estudios circadianos en ambos tejidos.

Abstract

Gene expression is the process by which information contained in the DNA of a cell is transformed into a useful product for it, like a functional protein or RNA. All cells in the same organism contain the same genetic information, it means they have the same genes, but not all genes are expressed at the same time. This process depends on several factors, including cell type and timing of its development. This makes the quantification of gene expression an important step in any laboratory of molecular biology. One of the most widely used techniques for studying gene expression is relative quantification, comparing the expression of the gene of interest with the levels of expression of a known gene, also called internal control.

In theory, a normalization gene or reference gene maintains a constant expression regardless of the cell type, the time of development of the plant and the environmental conditions. These types of genes are used as internal controls in methods of relative quantification, since maintaining their constant expression allows a greater precision in determining the level of expression of another gene by comparison. However, the literature demonstrates that traditionally used normalized genes can vary their expression under stress conditions, depending on the tissue studied, etc.

Because of this, it is increasingly common to identify and validate normalization genes, looking for candidates who maintain their constant expression under the conditions of the chosen experiment.

An RT-qPCR is a powerful and economical technique for relative quantification of gene expression. In this BsC thesis, this technique has been used to validate 7 genes commonly used in *P. hybrida* as normalization genes, studying its expression in circadian series, ie, taking several samples over a period of 24 hours. In this sense, *Petunia x hybrida* is a model plant that has demonstrated the influence of circadian rhythms in photosynthesis and emission of volatiles. Circadian rhythms are cyclical variations of the biological variables of living organisms, which are repeated with a period close to 24 hours. This BsC thesis will allow the use of identified genes like normalization genes in future assays in which RT-qPCR is used to study the expression of genes that are affected by circadian rhythms.

The genes studied were *Actin-11*, *Cyclophilin 2*, *Elongation factor 1 α* , *Glycerolaldehyde-3 phosphate dehydrogenase*, *Ribosomal protein S13*, *GTP-binding nuclear protein* and *Ubiquitin*, studying their behavior both in flower and leaf.

The results show that most of these genes are not valid for use as normalization genes. In flower the optimal genes are *Actin-11* and *Cyclophilin 2*; while in leaf *Elongation factor 1 α* and again *Actin-11* are the most stable. Therefore, these genes are recommended for use in circadian studies in both tissues.

Índice

1.- Abreviaturas.....	17
2.- Introducción.....	19
2.1.- Estudio de la expresión génica.....	19
2.2.- Técnicas de amplificación génica: PCR, qPCR y RT-qPCR.....	21
2.3.- Cuantificación absoluta y cuantificación relativa en RT-qPCR.....	26
2.3.1.- Método de PCR digital.....	26
2.3.2.- Método de la recta de calibrado.....	26
2.3.3.- Cuantificación relativa.....	28
2.4.- Identificación de genes de normalizado en RT-qPCR.....	29
2.5.- <i>Petunia x hybrida</i>	30
2.5.1.- <i>P. hybrida</i> como organismo modelo.....	30
2.5.1.- Series temporales y ritmos circadianos en <i>P. hybrida</i>	34
3.- Objetivos.....	37
4.- Materiales y métodos.....	39
4.1.- Genes seleccionados y muestreo.....	39
4.2.- Material vegetal y condiciones de cultivo.....	40
4.3.- Diseño experimental.....	41
4.3.1.- Toma de muestras.....	41
4.3.2.- Comprobación de los cebadores.....	41
4.3.3.- Extracción de RNA.....	42
4.3.4.- Ajuste de la concentración de RNA.....	43
4.3.5.- Reacción de retrotranscripción.....	43
4.3.6.- RT-qPCR.....	44
4.4.- Análisis de los datos.....	45
4.4.1.- Funcionamiento de Bestkeeper.....	45
4.4.2.- Funcionamiento de Normfinder.....	47
4.4.3.- Funcionamiento de Genorm.....	49
4.4.4.- Funcionamiento del método Δ Ct.....	50
4.4.5.- Funcionamiento de Reffinder.....	50

5.- Resultados y discusión	51
5.1.- Resultados Ct.....	51
5.2.- Análisis de la variabilidad en cada uno de los puntos de muestreo	53
5.3.- Análisis estadístico	61
5.4.- Análisis por Bestkeeper.....	63
5.5.- Análisis por Normfinder	64
5.6.- Análisis por Genorm	65
5.7.- Análisis por el método Δ Ct	67
5.8.- Análisis por Reffinder.....	68
5.9.- Discusión de los resultados	69
6.- Conclusiones	71
7.- Bibliografía.....	73

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>P. hybrida</i>	30
Tabla 2. Lista de genes del reloj circadiano de <i>Petunia</i> y otras solanáceas.....	35
Tabla 3. Características de los genes seleccionados.	39
Tabla 4. Resultados Ct en ACT.....	51
Tabla 5. Resultados Ct en CYP.....	51
Tabla 6. Resultados Ct en EF1 α	51
Tabla 7. Resultados Ct en GAPDH.....	51
Tabla 8. Resultados Ct en RPS13.....	52
Tabla 9. Resultados Ct en RAN1.....	52
Tabla 10. Resultados Ct en UBQ.....	52
Tabla 11. Estudio estadístico de los valores Ct por gen en pétalo.....	61
Tabla 12. Estudio estadístico de los valores Ct por gen en hoja.....	61
Tabla 13. Comparación de los niveles de expresión entre tejidos.....	61
Tabla 14. Estudio estadístico de los valores Ct por gen.....	62

Índice de figuras

Figura 1. A partir del genoma (genotipo), y mediante la transcripción, se forman diferentes tipos de RNAs con diferentes funciones. A todo este conjunto se le llama transcriptoma. A partir del tRNA, los ribosomas y el mRNA se obtienen proteínas, en un proceso llamado traducción. A todo el conjunto de proteínas traducidas se le llama proteoma. Estas proteínas pueden experimentar diferentes cambios una vez incorporadas al metabolismo del organismo, conocidos como modificaciones post-traduccionales. A todo el conjunto de metabolitos se le llama metaboloma. Tanto el proceso de transcripción, traducción como el metabolismo proteico están influidos por las interacciones del organismo con el ambiente que lo rodea. 19

Figura 2. La GFP es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria* que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible. En este caso, el gen que produce la GFP ha sido incorporado en la secuencia reguladora de otro gen de interés, de este modo, los ratones que emiten fluorescencia son aquellos que expresan este gen. Fuente: <http://proteopedia.org/wiki/index.php/GFP> [90]. 20

Figura 3. Una PCR tiene tres fases que se repiten cíclicamente. En la primera se produce la desnaturalización del DNA, lo que produce que las dos hebras de DNA se separen. En la segunda los cebadores se unen a la región con la cual tienen afinidad. En la tercera la polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA tomando como molde la hebra original. Fuente: https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction. 22

Figura 4. Estructura molecular de adenina, timina, guanina y citosina y apareamiento entre bases. Fuente: <http://basesnitrogenadas601.blogspot.com.es/2012/05/bases-nitrogenadas.html> [91]. 22

Figura 5. Visionado de los resultados de una PCR y posterior electroforesis. A la izquierda de la imagen aparece una referencia del tamaño de los fragmentos según su posición en pares de bases (pb). La primera columna se corresponde con el ladder o marcador de peso molecular, que sirve para conocer el tamaño de los fragmentos amplificados en la PCR. Las letras A y D y los números del 1 al 10 se corresponden con los fragmentos amplificados en la PCR. La última columna de la derecha es el control negativo, necesario para descartar contaminaciones con DNA extraño. Fuente: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922011000100001 [92]. 23

Figura 6. Transcriptasa reversa (inversa) con actividad endo H. Fuente: <http://apuntesbiologiamol.blogspot.com.es/2014/05/tipos-de-pcr.html> [93]. 24

Figura 7. Ejemplo de curva de curva de amplificación. La línea horizontal intermitente negra representa el valor de fluorescencia umbral, mientras que la línea vertical intermitente verde representa el ciclo umbral. La curva azul representa una muestra tipo de PCR, la línea roja representa una muestra en la que no se amplifica ningún material genético. Una curva de amplificación tiene 4 fases distintas: Una primera fase (1) en la que el nivel de fluorescencia está por debajo del nivel de detección umbral. Una fase exponencial (2) donde la PCR se efectúa con una eficiencia próxima a 2, en esta fase se llega al ciclo umbral y se obtiene el valor Ct. La tercera fase (3) se corresponde con un crecimiento de la fluorescencia lineal, esto es debido a que los componentes de la PCR se van agotando y la eficiencia de la PCR no es óptima. Y una fase final (4) donde se estabiliza el valor de fluorescencia. 25

Figura 8. Cariograma de *P. hybrida*. La primera y segunda columna muestran el grupo y el número del cromosoma. La tercera columna muestra el índice centrómerico, un cociente entre el peso del brazo largo del cromosoma dividido entre la suma del brazo largo y el corto. La cuarta columna muestra el peso relativo del centrómero con respecto al peso total del cromosoma. La quinta columna muestra una representación de cada cromosoma. La sexta columna muestra una curva de intensidad de fluorescencia del cromosoma, el punto de menor intensidad de fluorescencia es donde se sitúa el centrómero. Fuente: Monographs of theoretical and applied genetics: Petunia [41]. 31

Figura 9. Principales temas de investigación en los que se utiliza a *P. hybrida* como organismo modelo. Fuente: Vandenbussche et al. (2016) [42]. 32

Figura 10. Ejemplos de algunos mutantes de desarrollo floral en *P. hybrida* y líneas estándar de tipo salvaje. Las imágenes no están a la misma escala. (a) *P. hybrida* W138, variedad con un alto número de copias del elemento transponible dTph1, muy utilizada en investigación. (b) *P. hybrida* variedad Mitchell (Se ha abierto la flor por la mitad para mostrar su organización interna). (c) El ovario mutante fbp5 que muestra óvulos similares al tipo salvaje y al mutante fbp2 (izquierda); Ovario gigante doble mutante fbp2 y fbp5 que muestra un denso sistema de hojas que sustituyen el óvulo (derecha). La pared del carpelo, el estilo y el estigma se han eliminado para mostrar los órganos internos. (d) Flor mutante ciega (bl) con corola reemplazada por anteras. (e) Triple mutante phglo1, phglo2 y bl. (f) Doble mutante phglo1 y phglo2 con verticilos en los que se desarrollan sépalos y verticilos en los que se desarrollan carpelos. (g) Mutante phdef con pétalos convertidos en sépalos. (h) Flor tipo silvestre (arriba) y flor mutante mostrando defectos en la fusión entre pétalos. Fuente: Gerats et al. (2005) [59]. 33

Figura 11. Para cada cebador se utilizaron dos pocillos, uno con un control negativo para descartar contaminaciones (izquierda) y otro con el producto obtenido de la PCR. En la fila de arriba están los nombres de cada cebador. Aparece dos veces *RPS13*, en ese momento existían dos cebadores de *RPS13* en el laboratorio, por lo que se comprobó el estado de los dos. Como se puede ver, uno de los cebadores de *RPS13*, *ACT* y *EF1a* no amplificaron. 42

Figura 12. Ejemplo de PCR control para las muestras del punto A. A la izquierda se sitúa el ladder, después las seis muestras del punto A, con la banda de cDNA abajo. Como controles el gDNA, que ha corrido en varias bandas y el control negativo, donde no se aprecia ninguna contaminación. 44

Índice de gráficos

- Gráfico 1.** Curvas de amplificación de un banco de diluciones. La línea azul horizontal se corresponde con el valor de luminiscencia umbral. Fuente: http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf [95]. 27
- Gráfico 2.** Recta de calibrado obtenida a partir de los resultados obtenidos en el Gráfico 1. Fuente: http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf [95]. 27
- Gráfico 3.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de ACT separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo). 53
- Gráfico 4.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de CYP separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo). 54
- Gráfico 5.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de EF1 α separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo). 55
- Gráfico 6.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de GAPDH separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo). 56
- Gráfico 7.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de RPS13 separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo). 57
- Gráfico 8.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de RAN1 separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo). 58
- Gráfico 9.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de UBQ separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo). 59
- Gráfico 10.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de los genes en estudio separados por tejidos en el total de todos los puntos de muestreo. 60
- Gráfico 11.** Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Bestkeeper de los genes en estudio de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). 63
- Gráfico 12.** Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Bestkeeper de los genes en estudio separados por tejidos de los más estables (izquierda) a los menos estables

(derecha). La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés leave). 63

Gráfico 13. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Normfinder de los genes en estudio de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). 64

Gráfico 14. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Normfinder de los genes en estudio separados por tejidos de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés leave). Por motivos de espacio dentro del gráfico algunos nombres de los genes se han acortado, pasando EF1 α a EF1, GAPDH a GAD y RPS13 a RPS. 65

Gráfico 15. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Genorm de los genes en estudio de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). 65

Gráfico 16. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Genorm de los genes en estudio separados por tejidos de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés leave). Por motivos de espacio dentro del gráfico algunos nombres de los genes se han acortado, pasando EF1 α a EF1, GAPDH a GAD y RPS13 a RPS. 66

Gráfico 17. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por el método Δ Ct de los genes en estudio de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). 67

Gráfico 18. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por el método Δ Ct de los genes en estudio separados por tejidos de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés leave). Por motivos de espacio dentro del gráfico algunos nombres de los genes se han acortado, pasando EF1 α a EF1, GAPDH a GAD y RPS13 a RPS. 67

Gráfico 19. Clasificación de los genes más estables por Reffinder. 68

Gráfico 20. Clasificación de los genes más estables por Reffinder según tejidos. La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés leave). Por motivos de espacio dentro del gráfico algunos nombres de los genes se han acortado, pasando EF1 α a EF1, GAPDH a GAD y RPS13 a RPS. 68

1.- Abreviaturas

A → Adenina.

C → Citosina.

cDNA → DNA complementario.

DNA → Ácido desoxirribonucleico.

dNTP → Desoxirribonucleótido trifosfato.

G → Guanina.

gDNA → DNA genómico.

GFP → Proteína verde fluorescente, del inglés *Green fluorescent protein*.

iRNA → RNA interferente.

miRNA → microRNA.

mRNA → RNA mensajero.

OMG → Organismo modificado genéticamente.

PCR → Reacción en cadena de la polimerasa, en inglés *polymerase chain reaction*.

qPCR → PCR en tiempo real o PCR cuantitativa, en inglés *quantitative PCR*.

RNA → Ácido ribonucleico.

rRNA → RNA ribosómico.

RT-qPCR → PCR de retrotranscripción en tiempo real, en inglés *real time qPCR*.

snRNA → RNA nuclear corto, en inglés *small nuclear RNA*.

T → Timina.

tRNA → RNA de transferencia.

ZT → Zeitgeber Time, estándar de tiempo basado en un sincronizador, en este caso luz.

2.- Introducción

Existen numerosas técnicas que permiten cuantificar la expresión génica. Para una mejor comprensión de este trabajo fin de grado, en este apartado se estudiarán esas técnicas, además de analizar como se realiza una RT-qPCR.

De igual manera, *Petunia x hybrida* no es el único organismo modelo utilizado en plantas, por lo que se hace necesario saber que características lo convierten en un organismo digno de estudio, así como las razones específicas por las que se ha elegido para este trabajo fin de grado.

2.1.- Estudio de la expresión génica

La expresión génica es el proceso mediante el cual la información contenida en un gen es utilizada para la creación de un producto génico funcional. Este producto funcional puede ser una proteína o una molécula de RNA funcional. En todos los organismos vivos las células regulan la expresión génica activando y desactivando genes y esta expresión es generalmente proporcional al número de copias de mRNA de un gen determinado. Este hecho es crucial si se trata de identificar la presencia de productos celulares específicos, ya que el mRNA es traducido en los ribosomas para formar proteínas. Por lo tanto, es posible obtener datos relativos a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida [1]. La Figura 1 muestra un esquema de los pasos que tiene la expresión génica, desde el genotipo hasta el fenotipo.

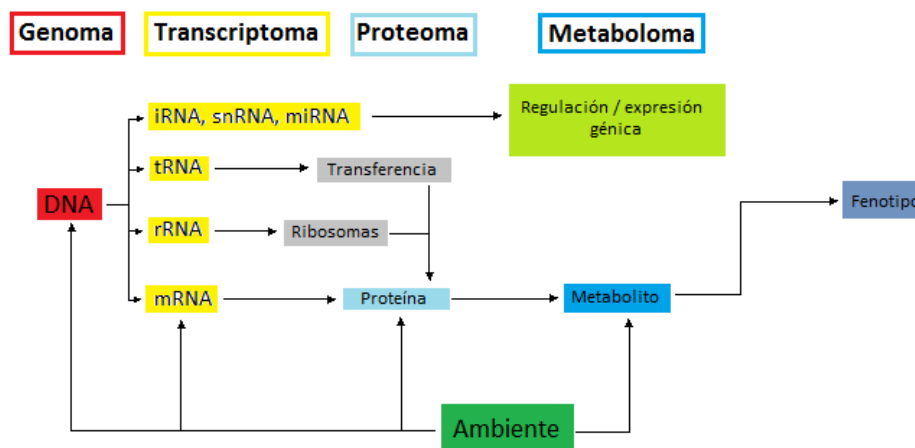


Figura 1. A partir del genoma (genotipo), y mediante la transcripción, se forman diferentes tipos de RNAs con diferentes funciones. A todo este conjunto se le llama transcriptoma. A partir del tRNA, los ribosomas y el mRNA se obtienen proteínas, en un proceso llamado traducción. A todo el conjunto de proteínas traducidas se le llama proteoma. Estas proteínas pueden experimentar diferentes cambios una vez incorporadas al metabolismo del organismo, conocidos como modificaciones post-traduccionales. A todo el conjunto de metabolitos se le llama metaboloma. Tanto el proceso de transcripción, traducción como el metabolismo proteico están influidos por las interacciones del organismo con el ambiente que lo rodea.

Existen numerosas técnicas que permiten el estudio de la expresión génica, entre las que se encuentran:

Gen reportero o gen chivato (en inglés, *reporter gene*). Un gen contiene dos segmentos funcionales. Uno de ellos es una secuencia de DNA que contiene la información necesaria para sintetizar un producto génico funcional, a este segmento se le conoce como zona transcrita. Al otro segmento se le llama promotor, el promotor está conectado con la región transcrita del gen y regula la transcripción de este a moléculas de mRNA, ya sea activando o suprimiendo su expresión [2].

Un gen reportero es un gen que se vincula a la secuencia regulatoria de otro gen. Ciertos genes son elegidos como reporteros porque las características otorgadas por el gen en la expresión de los organismos los hacen fáciles de identificar y medir, o porque son marcadores seleccionables. Los genes reporteros son usualmente usados para indicar si un determinado gen ha sido incorporado o expresado en una célula o una población de organismos [3,4]. La Figura 2 muestra los efectos de la GFP sobre el ratón de laboratorio, *Mus musculus*.



Figura 2. La GFP es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria* que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible. En este caso, el gen que produce la GFP ha sido incorporado en la secuencia reguladora de otro gen de interés, de este modo, los ratones que emiten fluorescencia son aquellos que expresan este gen. Fuente: <http://proteopedia.org/wiki/index.php/GFP> [90].

Transferencia Northern (en inglés, *Northern blot*). En esta técnica se extrae el mRNA total de un tejido, se corta usando enzimas de restricción y después se fracciona usando una electroforesis, que separa las cadenas de mRNA en función de su tamaño. La técnica de electroforesis se explica con más detalles en el apartado 2.2. Después del fraccionamiento, los fragmentos separados se transfieren a una membrana porosa, donde mantienen sus posiciones relativas. Como último paso, un gen clonado se utiliza como sonda marcada con radiactividad o digoxigenina y marcará el mRNA de interés en función de si este está presente al hibridarse al mismo [5].

Hibridación in situ por fluorescencia (en inglés, *fluorescent in situ hybridization* o *FISH*). La hibridación in situ por fluorescencia es una técnica citogenética que utiliza sondas fluorescentes que se unen sólo a las partes del cromosoma con un alto grado de complementariedad de secuencias. Se utiliza para detectar y localizar la presencia o ausencia de secuencias de DNA específicas en los cromosomas [6,7].

DNA microarray. Un microarray o micromatriz (también conocido como chip de DNA o biochip) es una colección de puntos microscópicos de DNA unidos a una superficie sólida. Los microarrays de DNA se utilizan para medir los niveles de expresión de un gran número de genes simultáneamente o para genotipar múltiples regiones de un genoma. Cada punto de DNA contiene entre 10-12 picomoles (pmol) de una secuencia de DNA específica, conocida como sonda. Esta puede ser una sección corta de un gen u otro elemento de DNA que se usa para hibridar una muestra de cDNA (denominada diana) en condiciones de alta restricción. La hibridación sonda-objetivo suele detectarse y cuantificarse mediante la detección de dianas marcadas con fluoróforo, plata o quimioluminiscencia para determinar la abundancia relativa de secuencias de ácido nucleico en el blanco [8].

RT-qPCR. La RT-qPCR es una de las técnicas de análisis genético más potentes y sensibles disponibles. Se utiliza para una amplia gama de aplicaciones, incluyendo análisis de expresión génica cuantitativa, genotipificación, validación de dianas de fármacos, descubrimiento de biomarcadores, detección de patógenos y medición de la interferencia de RNA [9]. Su funcionamiento se explica en detalle en el apartado 2.2.

2.2.- Técnicas de amplificación génica: PCR, qPCR y RT-qPCR

Una PCR es una técnica de amplificación de DNA in vitro. La estrategia básica de la PCR consiste en utilizar múltiples copias de un par de cebadores, es decir, pequeñas hebras de DNA (generalmente entre 18 y 22 bases) sintetizadas químicamente, que se unen cada una a un extremo diferente del gen o región que se quiere amplificar. Una polimerasa, que es una enzima capaz de replicar el DNA, añade bases a estos cebadores y el proceso de polimerización va y viene entre ellos, formando un número de moléculas de DNA que crece exponencialmente [5]. En la Figura 3 se muestra un esquema de como se realiza este proceso.

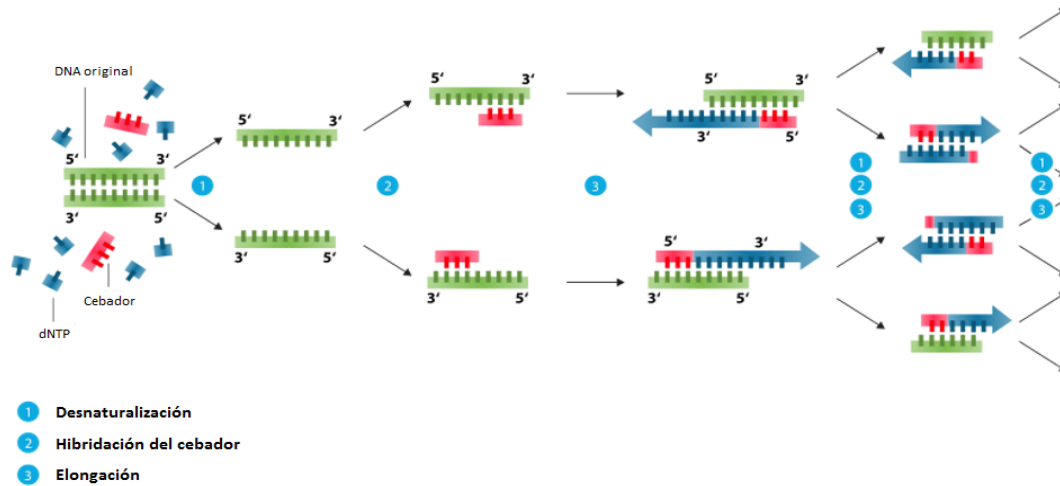


Figura 3. Una PCR tiene tres fases que se repiten cíclicamente. En la primera se produce la desnaturalización del DNA, lo que produce que las dos hebras de DNA se separen. En la segunda los cebadores se unen a la región con la cual tienen afinidad. En la tercera la polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA tomando como molde la hebra original. Fuente: https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction [91].

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos, cada ciclo suele consistir en 3 pasos a diferentes temperaturas. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Estos incluyen la enzima usada para la síntesis de DNA, la concentración de iones divalentes y de los dNTPs en la reacción, la temperatura de unión de los cebadores así como la longitud del DNA que se desea amplificar.

En primer lugar, se desnaturaliza el DNA (se separan las dos cadenas de las cuales está constituido). Este paso se consigue aplicando altas temperaturas a la cadena de DNA que se quiere desnaturalizar, generalmente entre 94-96 °C. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende de la proporción de GC que tenga la cadena, como también del largo de la misma. Los pares GC, por su estructura molecular, están conectados entre sí por tres puentes de hidrógeno, mientras que los pares AT por dos, esto determina la energía necesaria para desnaturalizar una cadena de DNA y por tanto la temperatura necesaria en la PCR. La Figura 4 muestra la estructura molecular de A, T, G y C y los enlaces que se forman entre sí, también conocido como apareamiento entre bases.

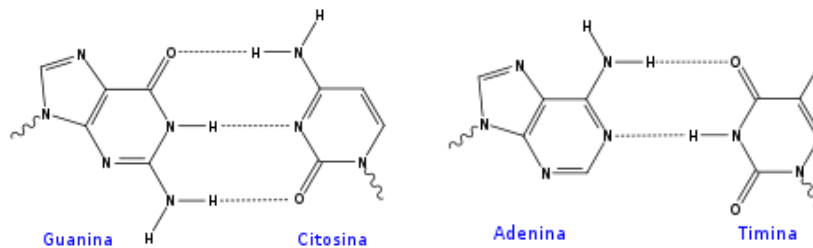


Figura 4. Estructura molecular de adenina, timina, guanina y citosina y apareamiento entre bases. Fuente: <http://basesnitrogenadas601.blogspot.com.es/2012/05/bases-nitrogenadas.html> [92].

A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el DNA molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a aproximadamente 68 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de DNA sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del DNA molde.

Una vez producida la hibridación actúa la polimerasa, tomando el DNA molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo DNA. Este proceso se conoce como elongación. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTPs complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de DNA creciente. La temperatura para este paso depende de la DNA polimerasa que usemos. Para la polimerasa Taq, una de las más utilizadas, la temperatura de máxima actividad está en unos 72 °C. El tiempo de extensión depende tanto de la DNA polimerasa usada como de la longitud del fragmento de DNA que se va a amplificar [10].

Tras una PCR se hace inevitable la realización de una electroforesis en gel para visualizar los resultados. Esta técnica se utiliza para separar y analizar macromoléculas (DNA, RNA y proteínas) y sus fragmentos en función de su tamaño y carga eléctrica [11].

Las moléculas de ácido nucleico se separan aplicando un campo eléctrico para mover las moléculas cargadas negativamente a través de una matriz de agarosa u otras sustancias. Las moléculas más cortas se mueven más rápido y migran más lejos que las más largas debido a que su movimiento se realiza más fácilmente a través de los poros del gel. Este fenómeno se llama tamizado [10].

Para visualizar los resultados se suele utilizar bromuro de etidio. Esta sustancia tiene dos características que la hacen especialmente idónea para su uso en la electroforesis: la primera es que se intercala con el DNA; la segunda es que cuando se expone a la luz ultravioleta emite luz roja-anaranjada, permitiendo ver la migración de las moléculas de DNA al finalizar la electroforesis. La Figura 5 muestra un ejemplo del visionado de los resultados bajo luz ultravioleta.

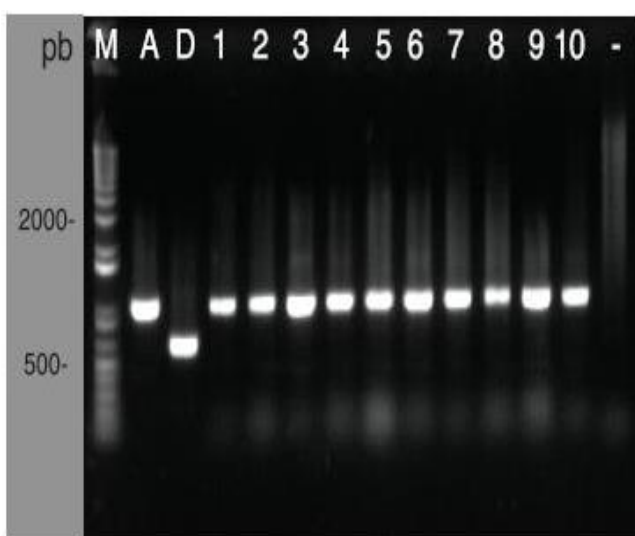


Figura 5. Visionado de los resultados de una PCR y posterior electroforesis. A la izquierda de la imagen aparece una referencia del tamaño de los fragmentos según su posición en pares de bases (pb). La primera columna se corresponde con el ladder o marcador de peso molecular, que sirve para conocer el tamaño de los fragmentos amplificados en la PCR. Las letras A y D y los números del 1 al 10 se corresponden con los fragmentos amplificados en la PCR. La última columna de la derecha es el control negativo, necesario para descartar contaminaciones con DNA extraño. Fuente: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922011000100001 [93].

Una qPCR es una variante de la PCR convencional, que se utiliza para poder medir el nivel del producto amplificado en cada ciclo de la PCR mediante la utilización de moléculas fluorescentes adheridas al DNA. Además, de esta forma se evita la necesidad de realizar una electroforesis en gel para detectar los productos de la amplificación. En muchos casos el producto que se utiliza para la qPCR no es desde el principio DNA, sino que puede ser cDNA, obtenido previamente por retrotranscripción de mRNA, en este caso, a esta técnica se le llama RT-qPCR [12,13].

Los pasos en los que se realiza una RT-qPCR son:

- 1.- El mRNA se copia en cDNA de hebra simple mediante la acción de una transcriptasa inversa y con la ayuda de un cebador oligo dT (también se pueden utilizar oligómeros aleatorios). Por lo general se utiliza una transcriptasa inversa con actividad endo H. La actividad endo H elimina la hebra simple de mRNA y crea una segunda hebra de cDNA, permitiendo que se una a la primera y creando así un cDNA de cadena doble. La Figura 6 muestra un esquema de este proceso.

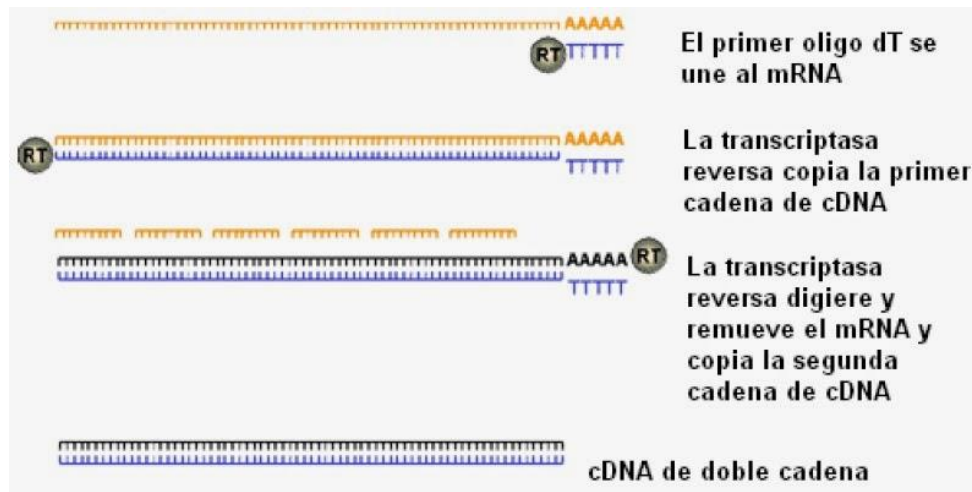


Figura 6. Transcriptasa reversa (inversa) con actividad endo H. Fuente: <http://apuntesbiologiamol.blogspot.com.es/2014/05/tipos-de-pcr.html> [94].

- 2.- Como en una PCR convencional, el cDNA se desnaturaliza a altas temperaturas de manera que las dos hebras se separan. Tras esto se enfría a unos 68 °C permitiendo el reconocimiento y acoplamiento de los cebadores específicos en cada hebra.
- 3.- Se eleva la temperatura a 72 °C, lo que promueve la acción de la DNA polimerasa que sintetiza dos hebras complementarias a partir de las dos originales. Mientras que se sintetizan las dos nuevas hebras de cDNA, las moléculas fluorescentes reconocen el cDNA de doble cadena que se está formando y se incorporan a él, quedando un cDNA que emite radiación fluorescente. Finalizado este paso, se vuelve a elevar la temperatura a unos 94-96 °C y se vuelve a repetir el proceso [13].

La qPCR se basa en la detección de una señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA existente durante la amplificación del material genético, de manera que se determina el ciclo concreto en el cual se detecta una intensidad de emisión fluorescente por encima de un nivel

prefijado. Este ciclo es conocido como ciclo umbral, en inglés *threshold cycle* [13]. Cuanto más DNA contenga inicialmente la muestra antes se alcanzará este ciclo umbral, por lo que será necesario un menor número de ciclos.

Otro concepto importante en una qPCR es la eficiencia de amplificación, definida como la fracción de moléculas de interés que se copian en cada ciclo de la PCR [14,15]. La máxima eficiencia que se puede obtener en una qPCR es de 2, es decir, en cada ciclo de qPCR el DNA de interés se duplica. Sin embargo, en la práctica la probabilidad de que en cada ciclo de PCR se duplique la cantidad de DNA de interés es menor que uno. Generalmente, esto es debido a un agotamiento de los componentes de la reacción, a una disminución en la actividad de la polimerasa o a ambos factores [15].

El resultado de una qPCR se visualiza mediante una curva de amplificación. Esta curva relaciona la fluorescencia con el número de ciclos de la qPCR. El valor Ct se corresponde con el ciclo umbral y es el dato que se suele extraer para después analizar los resultados de la qPCR. En la Figura 7 se muestra un ejemplo de curva de amplificación.

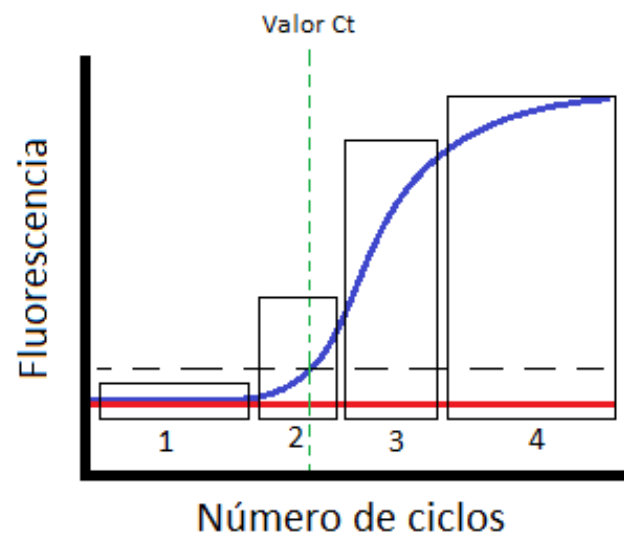


Figura 7. Ejemplo de curva de curva de amplificación. La línea horizontal intermitente negra representa el valor de fluorescencia umbral, mientras que la línea vertical intermitente verde representa el ciclo umbral. La curva azul representa una muestra tipo de PCR, la línea roja representa una muestra en la que no se amplifica ningún material genético. Una curva de amplificación tiene 4 fases distintas: Una primera fase (1) en la que el nivel de fluorescencia está por debajo del nivel de detección umbral. Una fase exponencial (2) donde la PCR se efectúa con una eficiencia próxima a 2, en esta fase se llega al ciclo umbral y se obtiene el valor Ct. La tercera fase (3) se corresponde con un crecimiento de la fluorescencia lineal, esto es debido a que los componentes de la PCR se van agotando y la eficiencia de la PCR no es óptima. Y una fase final (4) donde se estabiliza el valor de fluorescencia.

2.3.- Cuantificación absoluta y cuantificación relativa en RT-qPCR

Una vez obtenidos los resultados de una RT-qPCR, estos se pueden analizar de diferentes maneras [16]:

Cuantificación absoluta (método de PCR digital)	Cuantificación absoluta (método de la recta de calibrado)	Cuantificación relativa
En la cuantificación absoluta usando PCR digital, no se necesitan patrones conocidos. El objetivo de interés puede cuantificarse directamente con precisión determinada por el número de repeticiones de PCR digital.	En la cuantificación absoluta usando el método de la recta de calibrado, se cuantifican las incógnitas basándose en una cantidad conocida. Primero se crea la recta de calibrado, entonces se comparan incógnitas con la recta y se extrapola un valor.	En la cuantificación relativa, se analizan los cambios en la expresión génica en una muestra dada en relación con otra muestra de referencia (una muestra control).

2.3.1.- Método de PCR digital

Una PCR digital funciona dividiendo una única muestra en un gran número de reacciones de qPCR. En primer lugar, se diluye la muestra en placas de pocillos múltiples, de modo que haya, en promedio, una molécula de DNA por pocillo, realizándose una qPCR en cada pocillo. Tras la qPCR, se analiza cada pocillo individualmente con sondas fluorescentes, buscando la presencia de productos de PCR. Después del análisis de PCR, la fracción de respuestas negativas se utiliza para generar una respuesta absoluta para el número exacto de moléculas diana en la muestra [16,17].

2.3.2.- Método de la recta de calibrado

Para crear una recta de calibrado se utiliza un banco de diluciones de una concentración de DNA conocida. A continuación, se realiza una qPCR con el banco de diluciones obteniendo una curva de amplificación para cada dilución. En el Gráfico 1 se muestran las curvas de amplificación de un banco de diluciones.

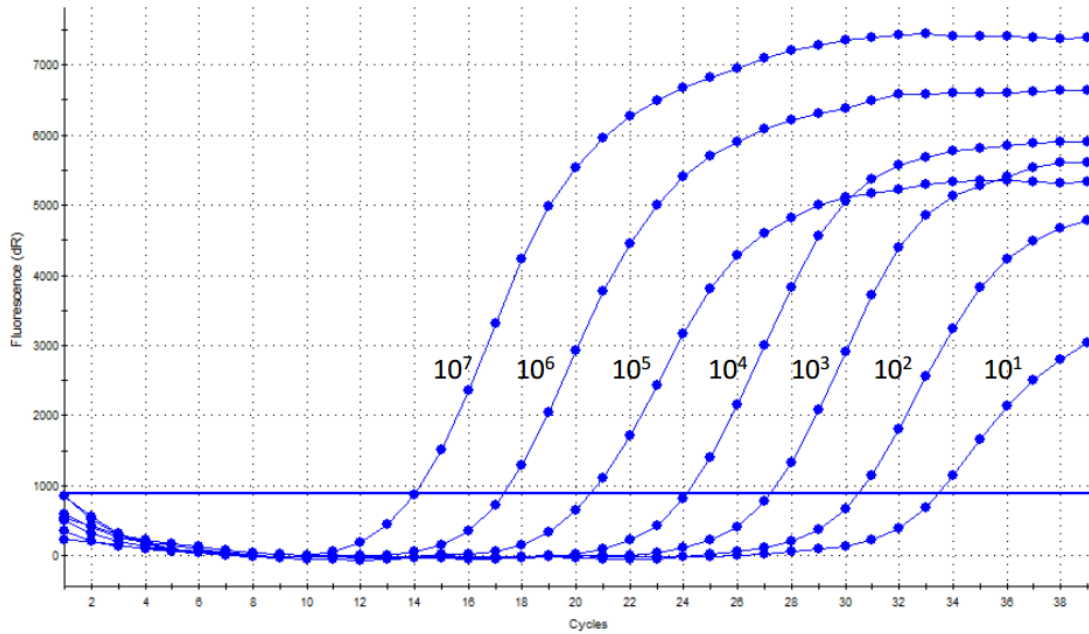


Gráfico 1. Curvas de amplificación de un banco de diluciones. La línea azul horizontal se corresponde con el valor de luminiscencia umbral. Fuente: http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf [95].

A partir de la qPCR, se pueden representar los valores Ct relacionados con la concentración inicial de DNA de cada muestra en escala logarítmica, generalmente se utilizan las unidades de número de copias de DNA / μl . El Gráfico 2 muestra un ejemplo de recta de calibrado a partir de los resultados obtenidos en el Gráfico 1. Esta recta sirve para determinar la concentración inicial de una muestra de DNA a partir del valor Ct obtenido en la qPCR. Para que este método sea eficaz y preciso debe de cumplirse que la eficiencia de amplificación de la qPCR de la muestra y los elementos de la recta de calibrado sea la misma.

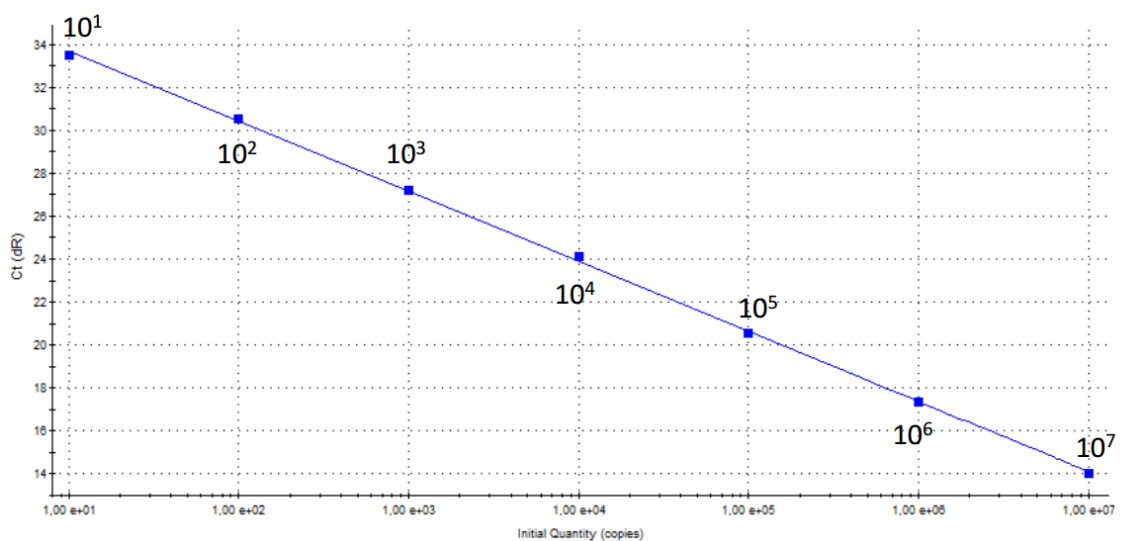


Gráfico 2. Recta de calibrado obtenida a partir de los resultados obtenidos en el Gráfico 1. Fuente: http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf [95].

2.3.3.- Cuantificación relativa

La cuantificación relativa presenta la expresión de un gen relacionándola a la expresión de otro gen, llamado control interno o calibrador, por lo que no requiere la realización de una recta de calibrado. Existen diversos métodos de cuantificación relativa, como el método Pfaffl [18], aunque uno de los más utilizados es el método comparativo Ct o *comparative Ct method*, también llamado método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [19]. Este método se basa en la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$Tasa\ de\ cambio = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (1)$$

O en su forma expandida (Ecuación 2):

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{[(Ct\ del\ gen\ de\ interés - Ct\ del\ control\ interno)\ muestra\ A - (Ct\ del\ gen\ de\ interés - Ct\ del\ control\ interno)\ muestra\ B]}{(2)} \quad (2)$$

La forma de esta ecuación permite comparar la expresión de un gen en dos muestras diferentes (muestra A y muestra B), cada muestra estando relacionada con un gen de control interno. La muestra A puede ser la muestra tratada y la muestra B la no tratada; la muestra A puede ser la muestra infectada con un virus y la muestra B no, etc.

El orden en el que se escribe la ecuación 2 no es relevante, aunque influye en la lectura de los resultados, de esta forma se interpreta de la siguiente manera: La expresión relativa del gen de interés en la muestra tratada (o infectada, o bajo las condiciones del experimento, etc) comparada con la muestra no tratada [19].

2.4.- Identificación de genes de normalizado en RT-qPCR

La cuantificación de la expresión génica a través de RT-qPCR es una de las técnicas más utilizadas actualmente, debido a su precisión, sensibilidad y alto rendimiento [20–23]. Un gen de normalizado o gen de referencia ideal actúa como control interno, es decir, su perfil de expresión es estable y mantiene unos niveles relativamente altos, en diferentes tejidos y tipos celulares bajo las condiciones experimentales [24,25].

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los genes comúnmente usados como genes de normalizado pueden no expresarse de forma estable dependiendo del tejido bajo estudio, el momento de desarrollo o de las condiciones experimentales. El uso de genes de normalizado no validados podría afectar en gran medida la cuantificación de los niveles de expresión del gen de interés. Por ejemplo, un estudio constató que sólo las variaciones en la expresión de los genes de normalizado podrían alterar hasta en 100 veces la variación encontrada en la expresión del gen objeto de estudio. En consecuencia hay un gran potencial para la interpretación errónea de los resultados [26,27].

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos ensayos sobre la identificación de genes de normalizado en diferentes especies vegetales: *Arabidopsis thaliana* [28], arroz [29], tomate [30], patata [31] y *Petunia x hybrida* [32]. La mayoría de estos estudios usaban una lista previa de genes de normalizado de otras especies de plantas y los usaban bajo sus propias condiciones experimentales.

Una vez formada la lista previa de genes se utilizan una serie de herramientas, basadas en software, que sirven para identificar estadísticamente el mejor gen de normalizado dentro de un grupo de genes candidatos y dado un conjunto definido de muestras biológicas. Algunas de las más utilizadas son geNorm [33], NormFinder [34], BestKeeper [35] o qBasePlus [36].

Para calcular los genes de normalizado idóneos estas herramientas utilizan diferentes algoritmos. Los programas geNorm y qBasePlus usan comparaciones entre pares y el promedio geométrico de los valores Ct para establecer los genes más estables. QBasePlus calcula un coeficiente de variación (CV) para cada gen como medida de estabilidad. BestKeeper utiliza análisis de correlación por pares de cada gen interno con un factor de normalización óptimo. Finalmente, NormFinder ajusta los datos a un modelo matemático, que permite comparar la variación intra e intergrupala y el cálculo de la estabilidad de la expresión.

2.5.- *Petunia x hybrida*

Debido a sus características botánicas y genéticas *P. hybrida* ha sido uno de los principales organismos modelos en el estudio de las plantas superiores, siendo utilizada en numerosos temas de investigación como son el desarrollo floral, la emisión de olor por parte de las flores o los ritmos circadianos.

2.5.1.- *P. hybrida* como organismo modelo

El género *Petunia*, perteneciente a la familia de las solanáceas, comprende numerosas especies. Este género es oriundo de las zonas templadas de Sudamérica, sobre todo de Argentina y Brasil [37]. Una de sus especies más representativas es *P. hybrida*, muy utilizada para jardinería e investigación. Esta especie es un híbrido que deriva del cruzamiento entre *P. integrifolia*, originaria de Brasil y *P. axillaris*, de Argentina [38,39]. La Tabla 1 muestra la taxonomía de *P. hybrida*.

Tabla 1. Taxonomía de *P. hybrida*.

Taxón	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Petunia</i>
Especie	<i>P. hybrida</i>

P. hybrida es una planta herbácea perenne, cultivada como anual. Suele desarrollarse hasta los 25-40 centímetros de altura. Sus tallos son herbáceos, de porte semierguido y ramificados. Sus hojas de color verde intenso crecen de forma alterna, son ovales u oblongas, ligeramente carnosas. Sus flores, pueden ser sencillas, semidobles o dobles, de bordes lisos u ondulados, de colores puros a combinados, entre los que se encuentran el rosa, rojo, blanco, etc. Su floración es abundante [40].

La especie *P. hybrida* es diploide y cuenta con 14 cromosomas ($n=7$, $2n=14$). Los 7 cromosomas diferentes de esta especie se pueden clasificar en 3 grupos basándose en la posición de sus centrómeros: El grupo A, con centrómeros metacéntricos o submetacéntricos, formado por los cromosomas I, IV y VII; el grupo B, con cromosomas subteloicéntricos, formado por los cromosomas II, III y el grupo C, con cromosomas acrocéntricos, formado por los cromosomas V y VI [41]. La Figura 8 muestra el cariograma de *P. hybrida*.

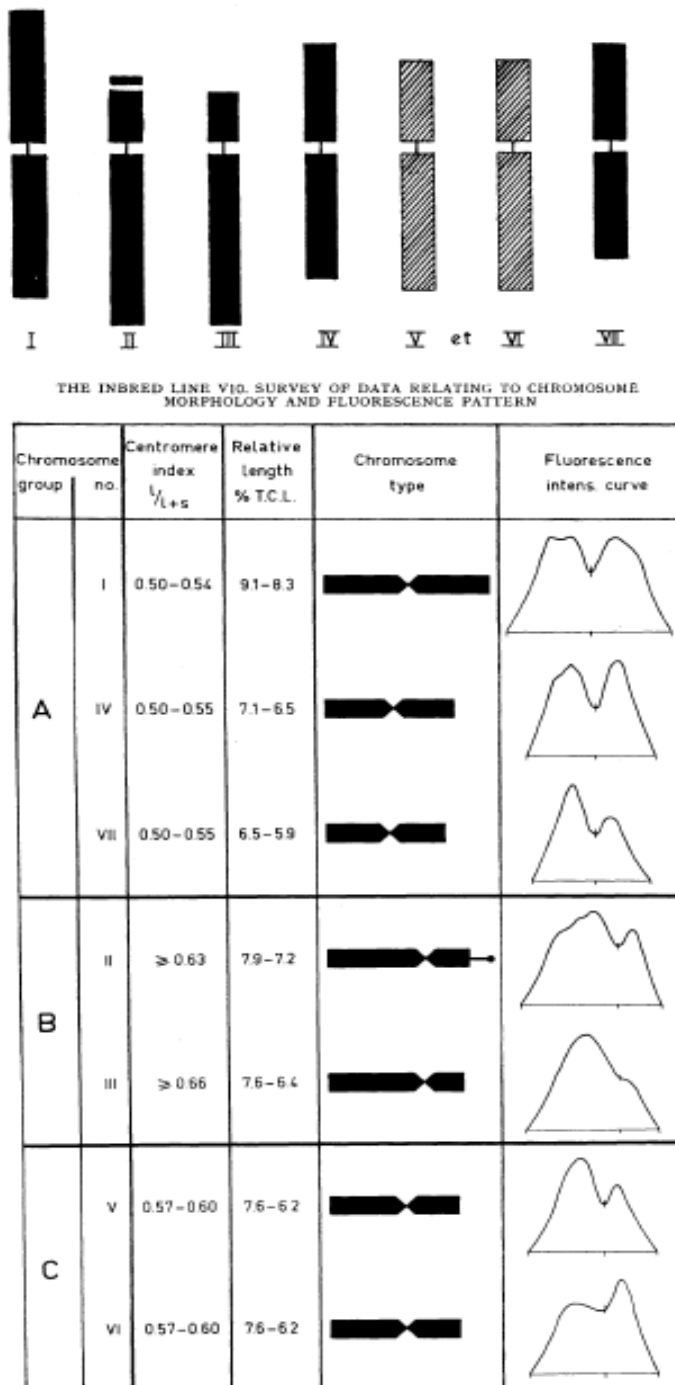


Figura 8. Cariograma de *P. hybrida*. La primera y segunda columna muestran el grupo y el número del cromosoma. La tercera columna muestra el índice centrómico, un cociente entre el peso del brazo largo del cromosoma dividido entre la suma del brazo largo y el corto. La cuarta columna muestra el peso relativo del centrómero con respecto al peso total del cromosoma. La quinta columna muestra una representación de cada cromosoma. La sexta columna muestra una curva de intensidad de fluorescencia del cromosoma, el punto de menor intensidad de fluorescencia es donde se sitúa el centrómero. Fuente: Monographs of theoretical and applied genetics: Petunia [41].

Como organismo modelo, *P. hybrida* tiene una serie de características que le confieren grandes ventajas [42]:

-Ciclo de vida corto y fácil cultivo: En condiciones óptimas, esta especie tiene un ciclo de semilla a semilla de 3-3,5 meses, pudiendo llegar a las 4 generaciones en un año. Además, a excepción de la línea Mitchell, caracterizada por su crecimiento en altura y su gran distancia entre nudos, *P. hybrida* tiene un crecimiento compacto, facilitando su cultivo en laboratorios de investigación.

-**Fácil propagación sexual y asexual:** Las grandes flores de *P. hybrida* facilitan enormemente su polinización manual, requiriendo únicamente unos segundos por flor. Además su propagación por esquejes también es muy sencilla, lo que resulta muy útil para la creación de poblaciones con idéntico material genético.

- **Transformación genética y bioquímica estables:** *P. hybrida* fue de las primeras especies en las que se consiguió crear un transgénico estable.

-**El sistema de elementos transponibles dTph1 en la línea W138 es una importante herramienta para ensayos genéticos:** La mutagénesis de inserción sigue siendo uno de los métodos de elección para obtener mutantes en genes de interés o en genes hasta ahora desconocidos. La clonación del elemento transponible de petunia dTph1 abrió el camino para la mutagénesis de inserción en petunia. Esto es muy interesante, puesto que se trata de un sistema de mutagénesis completamente natural, los mutantes obtenidos no son transgénicos y por lo tanto su uso no está limitado por las reglas de los OMG.

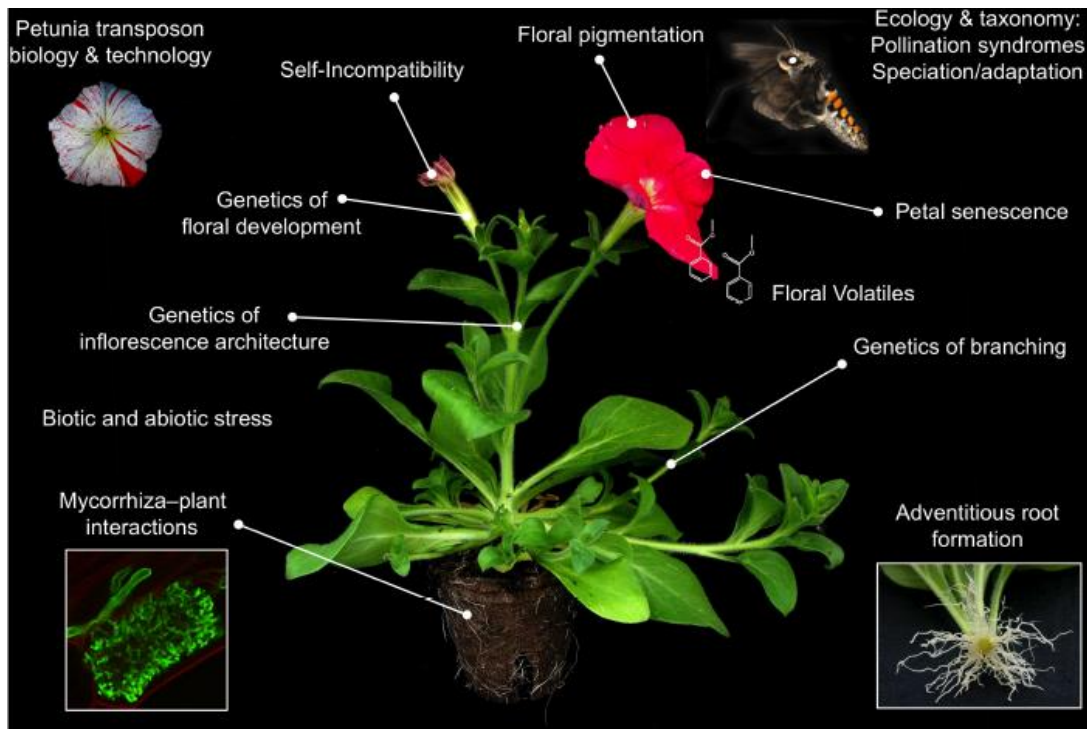


Figura 9. Principales temas de investigación en los que se utiliza a *P. hybrida* como organismo modelo. Fuente: Vandenbussche et al. (2016) [42].

Actualmente, los principales temas de investigación que se llevan a cabo utilizando *P. hybrida* como organismo modelo son: biosíntesis de flavonoides [43–46], desarrollo floral [47–49], estudios epigenéticos [50–52], auto-incompatibilidad [53,54], mapas genéticos [55], biología y tecnología de transposones [56] y ritmos circadianos [39,57,58]. La Figura 9 muestra, además de los ya comentados, otros temas en los que se utiliza *P. hybrida* como organismo modelo.

Las líneas de *Petunia* más utilizadas en investigación son V26 y Mitchell (también conocida como W115), ambas líneas conocidas por su gran capacidad de transformación, y W138, línea ya

comentada [42]. La Figura 10 muestra algunos ejemplos de mutantes y líneas estándar de tipo salvaje en *P. hybrida*.



Figura 10. Ejemplos de algunos mutantes de desarrollo floral en *P. hybrida* y líneas estándar de tipo salvaje. Las imágenes no están a la misma escala. (a) *P. hybrida* W138, variedad con un alto número de copias del elemento transponible dTph1, muy utilizada en investigación. (b) *P. hybrida* variedad Mitchell (Se ha abierto la flor por la mitad para mostrar su organización interna). (c) El ovario mutante *fbp5* que muestra óvulos similares al tipo salvaje y al mutante *fbp2* (izquierda); Ovario gigante doble mutante *fbp2* y *fbp5* que muestra un denso sistema de hojas que sustituyen el óvulo (derecha). La pared del carpelo, el estilo y el estigma se han eliminado para mostrar los órganos internos. (d) Flor mutante ciega (*bl*) con corola reemplazada por anteras. (e) Triple mutante *phglo1*, *phglo2* y *bl*. (f) Doble mutante *phglo1* y *phglo2* con verticilos en los que se desarrollan sépalos y verticilos en los que se desarrollan carpelos. (g) Mutante *phdef* con pétalos convertidos en sépalos. (h) Flor tipo silvestre (arriba) y flor mutante mostrando defectos en la fusión entre pétalos. Fuente: Gerats et al. (2005) [59].

La variedad Mitchell, utilizada en este ensayo, es un haploide duplicado de un híbrido complejo entre *P. axillaris* y el cultivar 'Rose of Heaven', exhibe capacidades superiores de fertilidad, crecimiento, cultivo de tejidos y transformación [59].

2.5.1.- Series temporales y ritmos circadianos en *P. hybrida*

Los experimentos de análisis de la expresión génica en series temporales son un método cada vez más popular para estudiar una amplia gama de sistemas biológicos. La diferencia entre un experimento estático y uno en series temporales es que en los experimentos de expresión estática se toma una instantánea de la expresión de uno o varios genes en diferentes muestras, mientras que en un experimento en series temporales se analiza un proceso temporal [60].

Este tipo de experimentos permiten estudiar procesos biológicos dinámicos, como determinar el conjunto de genes implicados en un proceso determinado, inferir las tasas de cambio en la expresión de un gen, el orden de expresión y efectos causales de una serie de genes o modelar los sistemas dinámicos dentro de una célula [61].

En este sentido, uno de los temas de investigación en donde más se utilizan este tipo de experimentos en series temporales es el estudio de los ritmos circadianos. Los ritmos circadianos son ritmos biológicos con una duración cercana a las 24 horas, regulan la actividad metabólica, hormonal y conductual de los organismos vivos. Estos ritmos son autosostenibles y persisten en ausencia de estímulos ambientales [62]. Las señales físicas, como la luz y la temperatura, y las señales químicas endógenas, como los niveles de azúcar o nitrógeno, pueden modificar su función [63–66].

Los ritmos circadianos están controlados por un mecanismo que se denomina comúnmente reloj circadiano u oscilador circadiano, que está dividido en tres partes: una parte está formada por genes que se encargan de la coordinación con el medio ambiente, una segunda es el llamado núcleo del reloj y la última parte está formada por aquellos genes que actúan como outputs del reloj.

El núcleo del reloj, a su vez, está formado por dos partes, los componentes positivos son genes que promueven la expresión de otros genes, los componentes negativos. Los componentes negativos tienen un doble papel, inhibiendo su propia expresión y promoviendo la expresión de los componentes positivos. De esta manera se crean bucles que oscilan de manera sostenida [67,68].

Actualmente, *Arabidopsis thaliana* es la planta superior donde mejor se conoce la estructura y función del reloj circadiano. Está formado por la familia de genes *PRR* (del inglés *Pseudo Response Regulator genes*) en concreto *PRR1* (también llamado *TOC1*), *PRR3*, *PRR5*, *PRR7* y *PRR9*, dos tipos de genes *MYB*, conocidos como *CCA1* (del inglés *Circadian Clock Associated 1*) y *LHY* (del inglés *Late Elongated Hypocotyl*) y los genes *ELF3*, *ELF4* (del inglés *Early flowering*), *LUX*, *ARRYTHMO* y *GI* (*Gigantea*) [39,69–73]. Los genes *PRR5*, *PRR7* y *PRR9* forman parte del bucle de la mañana, mientras que *PRR3* es un componente vascular específico del reloj. El bucle central lo forman *CCA1* y *LHY* junto con *TOC1*. Y el bucle nocturno los forman *ELF3*, *ELF4* y *LUX*, *ARRYTHMO*. *GI* regula el fotoperiodo floral [39,74,75].

En un reciente estudio se determinaron los genes que forman parte del reloj en *P. axillaris* y *P. inflata* partiendo de *A. thaliana* como molde para realizar la búsqueda [39]. La Tabla 2 muestra la lista de genes que forman parte del reloj de *Petunia* y otras solanáceas, obtenida del estudio comentado.

Tabla 2. Lista de genes del reloj circadiano de *Petunia* y otras solanáceas.

<i>Arabidopsis</i>	<i>P. inflata</i>	<i>P. axillaris</i>	Solanáceas
<i>PRR9</i>	<i>P.inflataPRR9</i>	<i>P.axillarisPRR9</i>	Duplicado en <i>N. benthamiana</i>
<i>PRR7</i>	<i>P.inflataPRR7a</i> <i>P.inflataPRR7b</i>	<i>P.axillarisPRR7a</i> <i>P.axillarisPRR7b</i>	Una o dos copias
<i>PRR5</i>	<i>P.inflataPRR5a</i> <i>P.inflataPRR5b</i>	<i>P.axillarisPRR5a</i> <i>P.axillarisPRR5b</i>	Una o dos copias
<i>PRR3</i>	<i>P.inflataPRR3</i>	<i>P.axillarisPRR3</i>	Una copia
<i>TOC1</i>	<i>P.inflataTOC1</i>	<i>P.axillarisTOC1</i>	Duplicado en <i>N. benthamiana</i>
<i>LHY</i>	<i>P.inflataLHY</i>	<i>P.axillarisLHY</i>	Una copia
<i>CCA1</i>	Ausente	Ausente	Ausente
<i>ELF3</i>	<i>P.inflataELF3</i> <i>P.inflataELF3a</i> <i>P.inflataELF3b</i> <i>P.inflataELF3c</i>	<i>P.axillarisELF3</i> <i>P.axillarisELF3a</i> <i>P.axillarisELF3b</i>	Tres o cuatro copias
<i>ELF4</i>	<i>P.inflataELF4a</i> <i>P.inflataELF4b</i>	<i>P.axillarisELF4a</i> <i>P.axillarisELF4c</i>	Duplicado
<i>LUX</i>	<i>P.inflataLUX</i>	<i>P.axillarisLUX</i>	Duplicado en <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. tuberosum</i>
<i>GI</i>	<i>P.inflataGI1</i> <i>P.inflataGI2</i> <i>P.inflataGI3</i>	<i>P.axillarisGI1</i> <i>P.axillarisGI2</i>	De dos a cuatro copias

Estudios realizados en *P. hybrida* han demostrado como rutas metabólicas tan importantes como son la emisión de olor floral o la fotosíntesis están reguladas por el reloj circadiano [57,58]. Además otros estudios indican que aspectos importantes de la morfogénesis floral podría estar influenciada por ciclos lumínicos y circadianos [76]. Estos hechos sitúan a *P. hybrida* como uno de los principales modelos en la investigación sobre ritmos circadianos.

3.- Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fin de grado es el de identificar genes de normalizado en series circadianas en *Petunia x hybrida*, es decir, determinar si los genes de interés en este trabajo fin de grado mantienen su expresión constante en un periodo de 24 horas. Para ello se ha utilizado tanto pétalo como hoja de *P. hybrida*, con el fin de determinar si existe algún gen utilizable como gen de referencia en ambos tejidos o, si por el contrario, es más conveniente seleccionar un determinado gen según el tejido objeto de estudio.

4.- Materiales y métodos

Para estudiar la expresión de los genes seleccionados se ha utilizado la técnica de RT-qPCR debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez comparada contra otras técnicas de estudio de expresión génica.

En cuanto al análisis de los datos obtenidos, se han llevado a cabo diferentes análisis estadísticos y se han utilizado diferentes herramientas de cuantificación relativa para seleccionar los genes de normalizado apropiados. Las técnicas de cuantificación relativa son menos laboriosas que las técnicas de cuantificación absoluta al no requerir una recta de calibrado, además son más económicas, por lo que en este caso han sido las técnicas utilizadas.

4.1.- Genes seleccionados y muestreo

A partir de una lista previa, basada en los genes comúnmente utilizados en otros estudios como genes de normalizado, los genes finalmente seleccionados han sido *Actin-11 (ACT)*, *Cyclophilin 2 (CYP)*, *Elongation factor 1 α (EF1 α)*, *Gliceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, *Ribosomal protein S13 (RPS13)*, *GTP-binding nuclear protein (RAN1)* y *Ubiquitin (UBQ)*.

En la Tabla 2 se muestran las accesiones de los genes seleccionados de la base de datos de solanáceas (Solanaceae Genomic Network, SGN) [77] y de la base de datos de *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Information Resource, TAIR) [78] (entre paréntesis, especie identificada como At); su e-valor, que hace referencia al grado de similitud entre dos genes al realizar un alineamiento de secuencias con el programa BLAST, cuanto más bajo es este valor, mayor es la similitud entre secuencias; la secuencia de los cebadores; el tamaño del amplicón de cada gen y su eficiencia tal como recoge Mallona et al. [32].

Tabla 3. Características de los genes seleccionados.

Nombre del Gen	Accesión	Tblast e-valor	Secuencia de los cebadores (forward/reverse)	Tamaño (pb)	Eficiencia
<i>ACT</i>	SGN-U208507 (At3 g12110.1)	2e-110	TGCACTCCCACATGCTATCCT/ TCAGCCGAAGTGGTCAAAGAG	108	1,75
<i>CYP</i>	SGN-U207595 (At2 g21130.1)	1,9e-75	AGGCTCATCATTCCACCGTGT/ TCATCTGCCAACTTAGCACCG	111	1,64
<i>EF1α</i>	SGN-U207468 (At5 g60390.1)	0	CCTGGTCAAATTGGAAACGG/ CAGATCGCCTGTCAATCTTGG	103	1,62
<i>GAPDH</i>	SGN-U209515 (At1 g42970.1)	9,2e-79	AACAACACTCACTCCTACACCGG/ GGTAGCACTAGAGACACAGCCTT	135	1,83
<i>RPS13</i>	SGN-U208260 (At4 g00100.1)	4e-77	CAGGCAGGTTAAGGCAAAGC/ CTAGCAAGGTACAGAAACGGC	114	1,70
<i>RAN1</i>	SGN-U207968 (At5 g20010.1)	1e-119	AAGCTCCCACCTGTCTGGAAA/ AACAGATTGCCGGAAGCCA	103	1,71
<i>UBQ</i>	SGN-U207515 (At4 g02890.2)	8e-107	TGGAGGATGGAAGGACTTTGG/ CAGGACGACAACAAGCAACAG	153	1,67

Para este ensayo se han tomado 24 muestras, 12 de pétalo y 12 de hoja, de 3 plantas diferentes y tomadas a diferentes horas. En este experimento, se ha tomado como referencia el inicio de la hora de luz, a este punto se le denomina ZT0 o *Zeitgeber Time 0*. En este caso ZT0 se corresponde con las 08:00.

Se han tomado muestras en 4 horas diferentes o puntos de muestreo: ZT3 (11:00), ZT9 (17:00), ZT15 (23:00) y ZT21 (5:00).

Para poder identificar cada muestra de forma rápida y sencilla, a cada una se le ha asignado un código de identificación, basado en números y letras, siguiendo las siguientes instrucciones:

-Primer dígito: A las muestras de pétalo se les denomina con la letra "F" y las muestras de hoja se les denomina con la letra "H".

-Segundo dígito: Según la planta de la que se haya extraído, a cada muestra se le ha asignado un 1, un 2 o un 3.

-Tercer dígito: Las muestras tomadas en el punto ZT3 se les denomina con la letra "A", a las tomadas en ZT9 se les denomina con la letra "C", a las tomadas en ZT15 se les denomina con la letra "E" y a las tomadas en ZT21 se les denomina con la letra "G".

Según este código de identificación, las 24 muestras se nombran de la siguiente manera:

F1A H1A	F1C H1C	F1E H1E	F1G H1G
F2A H2A	F2C H2C	F2E H2E	F2G H2G
F3A H3A	F3C H3C	F3E H3E	F3G H3G

Donde, por ejemplo, F2C es una muestra de pétalo, tomada de la planta número 2 y en el punto de muestreo ZT9, es decir, a las 17:00.

4.2.- Material vegetal y condiciones de cultivo

Para este ensayo el material vegetal utilizado ha sido *Petunia x hybrida* línea Mitchell, también llamada W115. Las plantas utilizadas se desarrollaron en la finca experimental "Tomás Ferro", dentro de los invernaderos pertenecientes al departamento de genética, situada en La Palma (Cartagena) y perteneciente a la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT).

Una semana antes del muestreo se trasladaron las plantas a una cámara de cultivo, que permite controlar condiciones tales como luz o temperatura, del Instituto de Biotecnología Vegetal, centro adscrito a la UPCT, donde se les indujo un periodo de aclimatación bajo las siguientes condiciones: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las temperaturas fueron de 23°C por el día y 18°C por la noche.

4.3.- Diseño experimental

4.3.1.- Toma de muestras

Se seleccionaron hojas jóvenes y flores completamente desarrolladas, esto quiere decir que se seleccionaron hojas con una longitud de entre 1,5 y 2,5 cm, y flores en el tercer día después de antétesis, de estas últimas solo se utilizaron los pétalos.

Tras la recogida de las muestras, estas se introducían en tubos de 1,5 ml y a su vez estos se sumergían en nitrógeno líquido para su congelación. Es de vital importancia congelar las muestras inmediatamente después de su toma, ya que lo que se pretende con esto es conservar los niveles de mRNAs de cada gen que existía en la muestra en el momento en el que se tomó, para así poder comparar con precisión las variaciones en esta concentración de mRNA a lo largo de 24 horas. Además, el hecho de sumergirlas en nitrógeno líquido, cuya temperatura es igual o inferior a $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, permite que las muestras se congelen instantáneamente, evitando la formación de cristales de hielo que pudiesen degradar los mRNAs. Una vez congeladas las muestras se conservaban a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

4.3.2.- Comprobación de los cebadores

Antes de iniciar el proceso de extracción del RNA y la reacción de retrotranscripción se hizo necesario un paso previo de comprobación de la viabilidad de los cebadores a utilizar, ya que llevaban en el laboratorio algún tiempo sin utilizarse y podían estar degradados. El único que no se comprobó fue *UBQ*, ya que en ese momento sí que era un cebador en uso y no hacía falta comprobar su estado.

Para ello se realizó una PCR con el KAPA Hifi HotStart ReadyMixPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS, <https://www.kapabiosystems.com/document/kapa-hifi-hotstart-readymix-tds/>). Si los cebadores no están degradados, durante el proceso de la PCR amplificarán, si por el contrario están degradados no se verá ningún resultado en la PCR, siendo este el modo de comprobar que están en buen estado.

Para la PCR se tomaron 10 μl de cada cebador (solución madre o *stock*) y se diluyeron con 90 μl de H₂O para una concentración de cada muestra de 10 mM (solución de trabajo). Con esta solución de trabajo se realizó la PCR.

Para la PCR se utilizó un termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 (ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/thermal-cyclers-realtime-instruments/thermal-cyclers/geneamp-pcr-system-9700/9700-discontinuation.html#>). En la realización de esta PCR se utilizó DNA de *P. hybrida*, además para cada par cebadores se incluyó un control negativo, en el que solo había H₂O en vez de DNA, para descartar cualquier contaminación por DNA extraño.

La PCR consistió en 25 ciclos, donde en cada ciclo se seguían los siguientes cambios de temperatura:

- 1° → 3 minutos a 95°C
- 2° → 20 segundos a 98°C
- 3° → 15 segundos a 65°C
- 4° → 15 segundos a 72°C

Para la electroforesis se utilizó un equipo PowerPac™ Basic Power Supply (BIORAD, <http://www.bio-rad.com/es-es/product/powerpac-basic-power-supply>).

La concentración del gel de agarosa fue del 1%, la tensión utilizada 80 V y el tiempo 20 minutos.

En la Figura 11 se muestran los resultados de la electroforesis. Los cebadores de *ACT* y *EF1α* no amplificaron, por lo que se supuso que estaban degradados y se sustituyeron por otros nuevos.

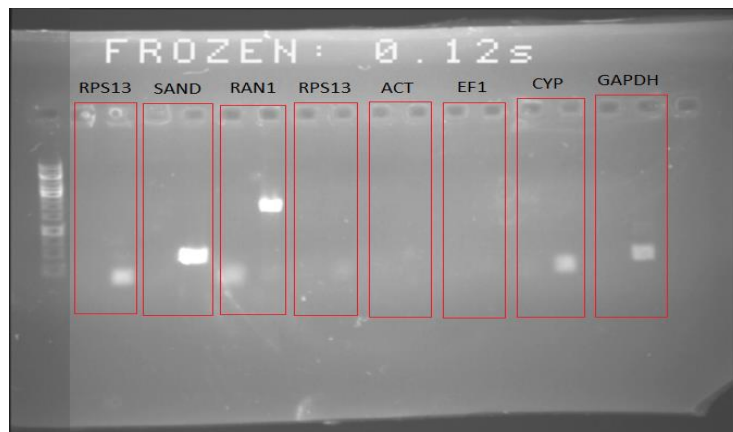


Figura 11. Para cada cebador se utilizaron dos pocillos, uno con un control negativo para descartar contaminaciones (izquierda) y otro con el producto obtenido de la PCR. En la fila de arriba están los nombres de cada cebador. Aparece dos veces *RPS13*, en ese momento existían dos cebadores de *RPS13* en el laboratorio, por lo que se comprobó el estado de los dos. Como se puede ver, uno de los cebadores de *RPS13*, *ACT* y *EF1α* no amplificaron.

4.3.3.- Extracción de RNA

El protocolo que se ha seguido para la extracción de RNA ha sido el propuesto por Box et al. (2011) [79], con las siguientes modificaciones:

- Las muestras se homogeneizaron en tubos de 1,5 ml utilizando un pequeño mortero de mano, con ayuda de nitrógeno líquido.
- Se sigue el resto del protocolo con la salvedad de que se utilizaran tubos de 1,5 ml en vez de placas de 96 pocillos.

Este protocolo se puede dividir en dos fases, la primera consiste en una serie de reacciones que sirven para aislar los ácidos nucleicos (DNA y RNA) de la muestra del resto de componentes celulares. En el segundo paso se utiliza un DNasa para degradar el DNA contenido en la muestra y así extraer el RNA de esta.

Al final de la extracción se han obtenido 24 muestras de RNA con un volumen de 50 μ l y de concentración desconocida.

4.3.4.- Ajuste de la concentración de RNA

Para saber la concentración de RNA total de cada muestra se mide en un espectrofotómetro. Un espectrofotómetro es un equipo conectado a un sistema informático que permite llevar a cabo una cuantificación de la materia de forma muy exacta y precisa en base a la medida de absorbancia de la misma. Permite medir desde concentraciones de DNA, RNA hasta proteínas. El espectrofotómetro utilizado ha sido un Nanodrop 2000 (NanoDrop, <http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>).

Para poder realizar la medición basta con 1 μ l de cada muestra, limpiando la lente del espectrofotómetro con H₂O entre muestra y muestra.

Para cada muestra se realizaron tres mediciones, y se asumió como concentración de RNA la media aritmética de las tres mediciones. A partir de las medidas obtenidas se ajustaron todas las muestras a la misma concentración de RNA, expresada como ng/ μ l.

4.3.5.- Reacción de retrotranscripción

Para la reacción de retrotranscripción se utilizó el Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, with dsDNase (ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1681>). El protocolo de este kit se divide en dos pasos, un primer paso para la eliminación de cualquier gDNA que pueda quedar en la muestra y un segundo paso en el que se realiza la reacción de retrotranscripción y la síntesis de cDNA. En este paso se seleccionaron algunas muestras como controles RT-, a este tipo de controles se les añaden todos los reactivos del kit a excepción de la transcriptasa inversa y sirven para descartar contaminaciones por gDNA.

Tras finalizar el protocolo, a cada muestra se le añadió 10 μ l de H₂O, para obtener una concentración final de 10 ng/ μ l.

Para comprobar que se ha realizado correctamente la reacción de retrotranscripción, tras este paso se realizó una PCR de control utilizando el KAPA Hifi HotStart ReadyMixPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS, <https://www.kapabiosystems.com/document/kapa-hifi-hotstart-readymix-tds/>). La PCR incluía las muestras, un control con gDNA para comprobar que la PCR se ha llevado a cabo de forma adecuada y un control negativo con H₂O para descartar contaminaciones por DNA.

La PCR consistió en 25 ciclos, donde en cada ciclo se seguían los siguientes cambios de temperatura:

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| 1° → 3 minutos a 95°C | 3° → 15 segundos a 65°C |
| 2° → 20 segundos a 98°C | 4° → 15 segundos a 72°C |

En este caso, en la electroforesis posterior a la PCR las muestras de cDNA tendrían que amplificar en una única banda de poco peso, por lo que tendrían que haber avanzado bastante en el gel de agarosa y el control negativo no tendría que mostrar nada. Las condiciones de la electroforesis y el equipo utilizado fue el mismo que en la comprobación de los cebadores. En la Figura 12 se muestra una imagen de la electroforesis tras la PCR control con las muestras F1A, F2A, F3A, H1A, H2A y H3A.

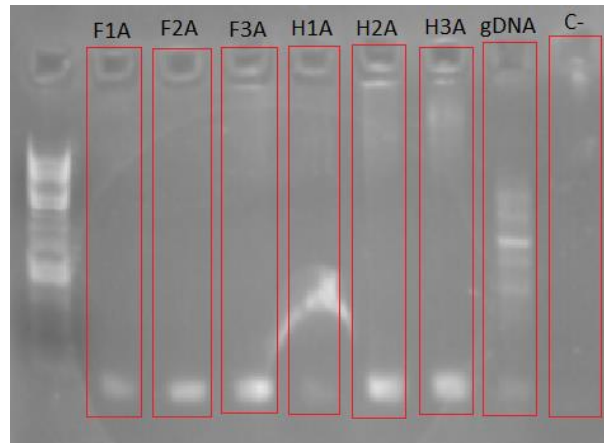


Figura 12. Ejemplo de PCR control para las muestras del punto A. A la izquierda se sitúa el ladder, después las seis muestras del punto A, con la banda de cDNA abajo. Como controles el gDNA, que ha corrido en varias bandas y el control negativo, donde no se aprecia ninguna contaminación.

4.3.6.- RT-qPCR

Para la RT-qPCR se ha utilizado el SYBR Green Master Mix: SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara, http://www.clontech.com/US/Products/Real-Time_qPCR_and_Reverse_Transcription/Real-Time_qPCR_SYBR_Detection/SYBR_Premix_Ex_Taq_II_Tli_Rnase_H_Plus).

Tras llevar a cabo el protocolo del kit se obtienen muestras con un volumen final de 20 μ l. Para la RT-qPCR se van a realizar dos réplicas técnicas por muestra, por lo que el volumen de 20 μ l de cada muestra se dividirá en dos, con un volumen de 10 μ l por cada réplica. Además se incluyen en la placa dos tipos de controles negativos, un control en el que la muestra de cDNA se sustituye por H₂O, también llamado NTC (del inglés *no template control*) para descartar contaminaciones por ácidos nucleicos extraños, y otro control en el que se ha omitido del protocolo el paso en el que se incluye la enzima retrotranscriptasa (los controles RT-), también llamado NAC (del inglés *no amplification control*) para descartar que haya gDNA no degradado en las muestras.

Las RT-qPCR se han llevado a cabo en un termociclador Mx3000P qPCR System (Agilent Technologies, <http://www.genomics.agilent.com/en/Mx3005P-Mx3000P-qPCR-Instruments-Software/Mx3000P-qPCR-System/?cid=AG-PT-199&tabId=AG-PR-1126>).

La PCR consistió en 40 ciclos, donde se han producido los siguientes cambios de temperatura:

1° → 5 segundos a 95°C

2° → 20 segundos a 60°C

Al iniciarse la RT-qPCR y previo al bucle anterior hay un primer paso que consiste en 30 segundos a 95°C. Además, en el último ciclo, posteriormente al bucle anterior y para finalizar la RT-qPCR se producen los siguientes cambios:

1° → 1 segundo a 95°C

2° → 30 segundos a 55°C

3° → 30 segundos a 95°C

4.4.- Análisis de los datos

Los datos obtenidos de la RT-qPCR han sido analizados con diferentes herramientas estadísticas, como son: Bestkeeper [35], Normfinder [34], Genorm [33], el método delta CT [80] y Reffinder [81].

Todas estas herramientas han sido seleccionadas en base a su gran aceptación por la comunidad científica, siendo utilizadas en numerosos artículos.

4.4.1.- Funcionamiento de Bestkeeper

Análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia. Se calculan la media aritmética (AM), media geométrica (GM), valor mínimo (Min), valor máximo (Max), desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV) en función de los valores Ct obtenidos. Se calculan los valores Xfold, que representan la sobreexpresión o la subexpresión de cada gen en función de la media geométrica y a partir de los Xfold máximo y mínimo (Ecuaciones 3 y 4), se calcula la desviación estándar de los valores Xfold. Los valores Xfold se corrigen a razón de la eficiencia de la RT-qPCR, E .

$$\text{Min}[x_{fold}] = E^{\text{Min}(Ct) - \text{GM}(Ct)} \quad (3)$$

$$\text{Max}[x_{fold}] = E^{\text{Max}(Ct) - \text{GM}(Ct)} \quad (4)$$

Después se puede realizar una primera estimación de la estabilidad de los genes en cuanto a sus niveles de expresión, basándose en los valores SD y CV. A partir de estos valores los genes de referencia pueden ser ordenados del más estable (valores SD y CV más bajos) al más inestable (valores SD y CV más altos). Los genes de referencia con un valor SD más alto que 1 pueden descartarse.

Partiendo de los genes considerados estables (valor SD menor o igual a 1), se puede calcular el Bestkeeper Index (BI) que es igual a la media geométrica de los valores Ct de los genes candidatos, siendo z el número de genes candidatos (Ecuación 5).

$$BI = \sqrt[z]{Ct1 \cdot Ct2 \cdot Ct3 \cdot \dots \cdot Ctz} \quad (5)$$

Análisis de las relaciones internas de los genes de referencia. Para estimar las relaciones intergenes de todos los posibles pares de genes se realizan numerosos análisis por pares. Dentro de cada comparación por pares se calcula el coeficiente de correlación de Pearson, r , el coeficiente de determinación, r^2 , y el p-valor.

Análisis de la integridad de la muestra y la estabilidad de la expresión de los genes de referencia. Dado que la aparición de valores atípicos puede oscurecer la precisión de la estimación, se analizan tanto la integridad como la estabilidad de expresión de las muestras individuales. La varianza intrínseca de expresión, $InVar$, se calcula como aparece en la Ecuación 6. Donde los términos entre paréntesis denotan una diferencia de los respectivos valores Ct observados (n) del gen de referencia (m) respecto del valor Ct medio del mismo gen de referencia (representado con una barra). Los resultados se expresan en unidades Ct, $[\mp Ct]$. Además, este valor puede expresarse como una eficiencia corregida intrínseca a los valores Xfold con respecto a la media Ct del mismo factor (Ecuación 7). Así, se justifica que las muestras que se desvíen fuertemente, debido a la preparación ineficiente de la muestra, a la reacción de retrotranscripción incompleta o a la degradación de la muestra, pueden ser eliminadas del cálculo del BI. Se recomienda eliminar las muestras del cálculo cuando varían en un ∓ 3 .

$$InVar_m[\mp Ct] = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Ct_n^m - \overline{Ct_n})^2 \quad (6)$$

$$InVar_m[\mp x_fold] = E_m^{InVar[\mp Ct]} \quad (7)$$

4.4.2.- Funcionamiento de Normfinder

Siendo y_{ij} la expresión logarítmica de la media de los valores para el gen i de la muestra j dentro del grupo de genes g . Y teniendo un total de k genes y G grupos de genes, y un número de medidas n_g dentro del grupo g . Un modelo natural para describir y_{ij} es la suma de tres términos (Ecuación 8).

$$y_{ij} = \alpha_{ig} + \beta_{gj} + \varepsilon_{ij} \quad (8)$$

El primer término, α_{ig} representa el nivel de expresión general de un gen candidato i dentro del grupo g . El segundo término, β_{gj} representa la cantidad de mRNA dentro de la muestra j . El último término, ε_{ij} es la variación aleatoria causada por factores biológicos y experimentales, con media igual a 0 y σ^2_{ig} .

El objetivo es estimar la variación intragrupo σ^2_{ig} , así como la variación intergrupo medida como la variación en α_{ig} , $g = 1, 2, 3, \dots, G$.

Estimación de la variación intragrupo. Para estimar las variaciones intragrupo se forman los residuos habituales para un modelo aditivo, se cuadran estos y se toma la suma de las muestras pertenecientes al grupo. Dividiendo la suma por $(n_g - 1)(1 - 2/k)$, se obtiene s^2_{ig} , y la estimación de σ^2_{ig} es la Ecuación 9.

$$\hat{\sigma}^2_{ig} = s^2_{ig} - \frac{1}{k(k-1)} \sum_{v=1}^k s^2_{vg}$$

(9)

Estimación de la variación intergrupo. Sea z_{ig} la media de y_{ij} sobre todas las muestras del grupo g . Si θ_g es la media de β_{gj} de todas las muestras del grupo g , entonces z_{ig} es $\alpha_{ig} + \theta_g$, y la varianza es σ^2_{ig}/n_g . Con respecto a la variación intergrupo, esta es la variación de $z_{ig} - \theta_g$, $g = 1, 2, 3, \dots, G$ que define la viabilidad del gen i como gen de referencia.

Valor de estabilidad. Habiendo ya estimado la variación intragrupo e intergrupo, se pueden combinar ambos factores para determinar la estabilidad del gen. De esta forma se agregan las dos fuentes de variación en una medida práctica del error sistemático que se comete al utilizar el gen investigado como gen de referencia.

Por tanto, es la distribución de $z_{ig} - \theta_g - \alpha_{ig}$ lo que define la estabilidad del gen i . Sin embargo, una distribución se puede considerar como una medida de estabilidad poco práctica, por lo que hay que reducirlo a un valor unidimensional definiendo el valor de estabilidad ρ_{ig} como el valor

absoluto de la media + 1 SD. Finalmente para estimar el valor de estabilidad, se necesita estimar $z_{ig} - \theta_{g} - a_{ig}$. Con ese fin, se hace la suposición de que el promedio de a_{ig} sobre los genes $i = 1, 2, \dots, k$ es independiente del grupo g . Entonces $z_{ig} - \theta_{g} - a_{ig}$ se puede estimar $d_{ig} = z_{ig} - \bar{z}_i - \bar{z}_g + \bar{z}_{..}$, donde las barras indican promedios, y el valor de estabilidad se define en la Ecuación 10.

$$\rho_{ig} = \frac{\hat{\gamma}^2 |d_{ig}|}{\hat{\gamma}^2 + \hat{\sigma}_{ig}^2/n_g} + \sqrt{\frac{\hat{\sigma}_{ig}^2/n_g}{\hat{\gamma}^2 + \hat{\sigma}_{ig}^2/n_g} + \frac{\hat{\gamma}^2 \hat{\sigma}_{ig}^2/n_g}{\hat{\gamma}^2 + \hat{\sigma}_{ig}^2/n_g}}$$

(10)

Donde γ^2 es la varianza de a_{ig} , y se estima en la Ecuación 11.

$$\gamma^2 = \frac{1}{(k-1)(G-1)} \sum_{i=1}^k \sum_{g=1}^G d_{ig}^2 - \frac{1}{kG} \sum_{i=1}^k \sum_{g=1}^G \hat{\sigma}_{ig}^2/n_g$$

(11)

Si γ^2 es positivo, de lo contrario se estima como 0.

Para obtener un valor único para el gen i , se toma ρ_i como el promedio de ρ_{ig} , $g=1, 2, \dots, G$.

Requerimientos. La validez de la aproximación está relacionada con el número de muestras y genes analizados, es decir, a mayor número de muestras y genes, mayor será la calidad de la estimación. El conjunto de muestras debe de contener al menos 8 muestras por grupo, y el número de candidatos debe ser de al menos 3 por razones técnicas, aunque se recomiendan 5-10. Es un requisito adicional que los genes se seleccionen entre un grupo de genes sin expectativa previa de diferencia de expresión entre grupos. Este requisito se utiliza para decir que el nivel de expresión promedio es el mismo en los diferentes grupos. Por lo tanto, en vez de suponer que los genes candidatos no muestran ninguna variación sistemática intergrupo, se supone que el promedio de los genes candidatos no muestra ninguna variación sistemática.

4.4.3.- Funcionamiento de Genorm

Error de normalización. Para una muestra de tejido m , se miden los niveles de expresión de la RT-qPCR, a_{ij} , de n muestras de genes de control internos. Para cada combinación de dos muestras de tejido p y q , y cada combinación de dos genes de control internos j y k , se calcula el error de normalización, E (Ecuación 12). E , por lo tanto, es la diferencia de expresión entre las muestras p y q cuando se normaliza con los genes de referencia j o k .

($\forall j, k \in [1, n], \forall p, q \in [1, m], j \neq k, p \neq q$):

$$R_{jkpq} = \frac{a_{qj}}{a_{qk}} \cdot \frac{a_{pk}}{a_{pj}}$$

(si $R < 1$, entonces $E = R^{-1}$, por lo que $E = R$)

(12)

Valor de estabilidad. Para cada combinación de dos genes de control internos j y k , se calcula un conjunto de valores A_{jk} , que consiste en una transformación logarítmica de base dos de la expresión de los ratios a_{ij} / a_{ik} (Ecuación 13). Se define la variación por pares, V_{jk} , de los genes de control interno j y k como la desviación estándar de todos los valores A_{jk} (Ecuación 14). El valor de estabilidad, M_j , del gen de control interno j se define como la media aritmética de la variación por pares V_{jk} (Ecuación 15).

($\forall j, k \in [1, n], j \neq k$):

$$A_{jk} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{1j}}{a_{1k}} \right), \log_2 \left(\frac{a_{2j}}{a_{2k}} \right), \dots, \log_2 \left(\frac{a_{ij}}{a_{ik}} \right) \right\} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{ij}}{a_{ik}} \right) \right\} i = 1 \rightarrow m \quad (13)$$

$$V_{jk} = st. desv(A_{jk}) \quad (14)$$

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n-1} \quad (15)$$

4.4.4.- Funcionamiento del método ΔCt

El método ΔCt determina la estabilidad de los genes candidatos mediante la comparación de la expresión relativa de "pares de genes" dentro de cada muestra. Si el valor de ΔCt de los dos genes permanece constante cuando se analiza en diferentes muestras significa que ambos genes se expresan de forma estable entre esas muestras. Sin embargo si ΔCt fluctúa, entonces uno o los dos genes se expresan de forma variable. La introducción de un tercer, cuarto, quinto gen en la comparación por pares proporciona más información sobre que genes muestran una menor variabilidad, y por tanto, que gen o genes tienen una expresión estable entre las muestras probadas.

Estabilidad relativa de los genes de referencia. La estabilidad de los genes se evalúa mediante su valor ΔCt y la desviación estándar. Teniendo en cuenta todos los genes y comparando todas las posibles combinaciones de genes en función de su valor Ct, se forma un patrón por el cual los genes tienden a estar asociados con niveles altos o bajos de desviación del ΔCt , lo que se relaciona con un nivel alto o bajo de variabilidad en la expresión génica.

4.4.5.- Funcionamiento de Reffinder

Reffinder es una herramienta online que permite introducir los datos obtenidos en una qPCR y obtener el análisis de la estabilidad de los genes en estudio por Bestkeeper, Normfinder, Genorm y el método ΔCt . Los resultados aparecen directamente como gráficos y ordenados de los genes más estables a los menos estables.

Además Reffinder también utiliza sus propios algoritmos para proporcionar al usuario un ranking con los genes más estables en función del análisis obtenido por Bestkeeper, Normfinder, Genorm y el método ΔCt .

5.- Resultados y discusión

A partir de los valores Ct se han realizado una serie de análisis para determinar los genes óptimos como genes de normalizado según el tejido estudiado y para ambos tejidos simultáneamente.

5.1.- Resultados Ct

Las Tablas 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 muestran los valores Ct obtenidos en las RT-qPCRs de *ACT*, *CYP*, *EF1 α* , *GAPDH*, *RPS13*, *RAN1* y *UBQ*.

Tabla 4. Resultados Ct en *ACT*.

Pétalo	ZT	Hoja
26,09	3	23,55
23,24	3	22,16
23,1	3	23,66
27,395	9	25,03
25,96	9	26,465
24,155	9	27,315
25,445	15	22,08
25,95	15	25,11
23,865	15	22,975
29,165	21	24,415
26,23	21	24,775
24,225	21	22,98

Tabla 5. Resultados Ct en *CYP*.

Pétalo	ZT	Hoja
24,56	3	19,503
21,79	3	19,05
21,005	3	19,955
25,325	9	20,095
23,955	9	22,565
20,98	9	24,27
22,83	15	19,87
22,83	15	22,87
22,23	15	20,15
26,48	21	21,195
24,48	21	22,155
22,32	21	20,49

Tabla 6. Resultados Ct en *EF1 α* .

Pétalo	ZT	Hoja
24,14	3	20,045
22,165	3	19,085
20,285	3	19,545
24,755	9	19,13
22,28	9	22,02
19,735	9	21,925
22,235	15	18,465
23,3	15	21,665
21,245	15	18,66
25,74	21	21,835
23,245	21	20,935
20,725	21	19,71

Tabla 7. Resultados Ct en *GAPDH*.

Pétalo	ZT	Hoja
30,13	3	19,873
28,748	3	19,89
26,9	3	19,855
33,34	9	20,605
32,78	9	24,115
30,315	9	24,56
30,95	15	20,045
33,48	15	23,575
30,145	15	18,975
31,97	21	20,025
31,755	21	20,545
26,945	21	19,65

Tabla 8. Resultados Ct en *RPS13*.

Pétalo	ZT	Hoja
30,115	3	23,055
27,23	3	23,27
24,615	3	23,371
31,015	9	25,89
28,415	9	26,9
25,23	9	27,91
26,89	15	22,95
27,88	15	26,855
26,84	15	23,045
33,07	21	26,18
28,43	21	25,77
25,945	21	23,675

Tabla 9. Resultados Ct en *RAN1*.

Pétalo	ZT	Hoja
27,41	3	21,935
24,925	3	21,685
23,32	3	22,185
29,59	9	28,225
25,895	9	27,438
24,385	9	26,65
26,18	15	25,47
25,47	15	24,63
24,76	15	26,31
31,125	21	23,71
27,88	21	24,41
24,915	21	22,82

Tabla 10. Resultados Ct en *UBQ*.

Pétalo	ZT	Hoja
21,46	3	20,15
19,28	3	19,295
20,825	3	17,65
19,025	9	18,03
20,26	9	19,21
17,79	9	18,25
16,56	15	16,355
17,435	15	18,695
16,735	15	15,99
20,46	21	16,715
16,725	21	17,415
14,685	21	16,815

Estos resultados se han obtenido al hacer la media aritmética de las dos replicas técnicas que se han realizado por cada muestra.

5.2.- Análisis de la variabilidad en cada uno de los puntos de muestreo

Los Gráficos 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 muestran la variabilidad de los genes en cada uno de los puntos de muestreo de *ACT*, *CYP*, *EF1 α* , *GAPDH*, *RPS13*, *RAN1* y *UBQ*.

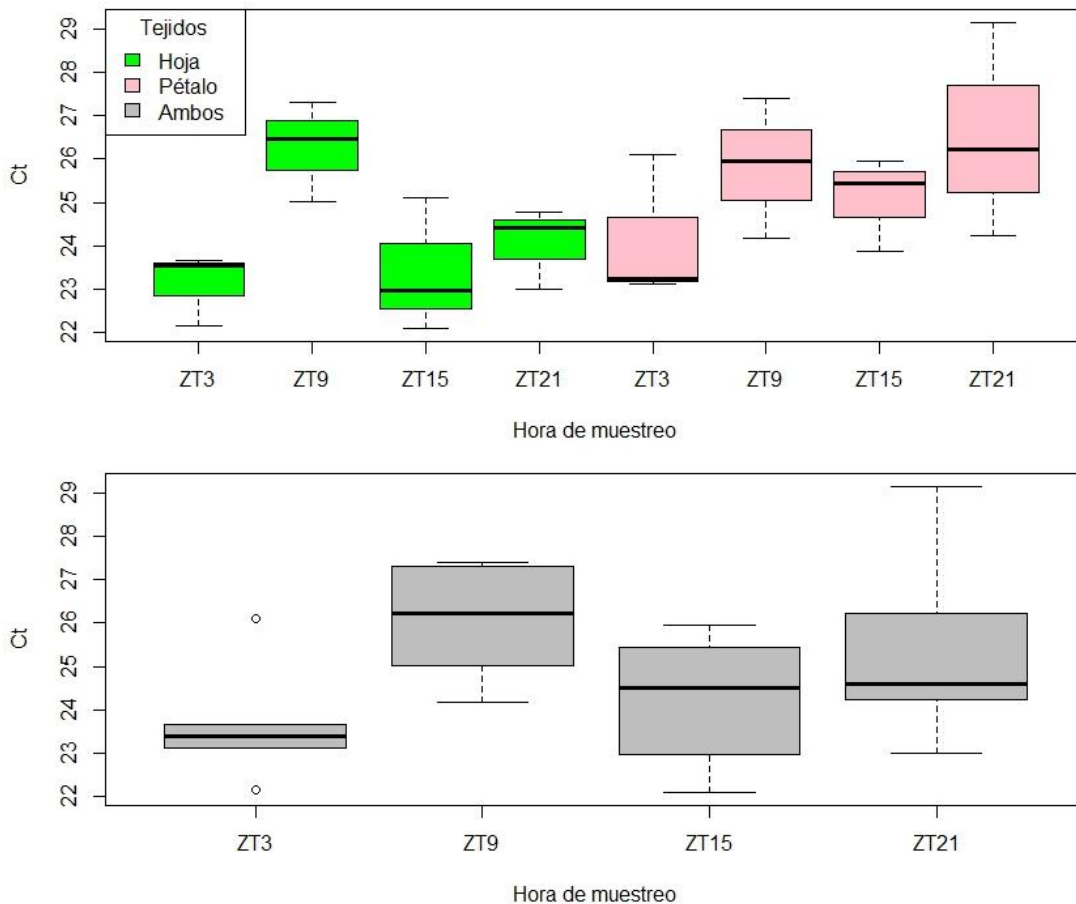


Gráfico 3. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de *ACT* separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo).

En el diagrama se observa como *ACT* tiene un comportamiento similar entre tejidos, observándose las mismas tendencias tanto en hoja como en pétalo. En ambos tejidos se aprecian las mismas variaciones en los niveles de expresión, en ZT3 hay unos valores Ct bajos, correspondiéndose con un alto nivel de expresión del gen; en ZT9 los valores Ct suben para volver a bajar en ZT15, aunque en hoja esta bajada es mucho más marcada; finalmente en ZT21 los valores Ct vuelven a subir, lo que se traduce en un bajo nivel de expresión de *ACT*, aunque existe una mayor diferencia de expresión entre tejidos que en el resto de puntos de muestreo.

Estas tendencias hacen que al analizar la variabilidad de *ACT* de forma conjunta, con ambos tejidos, en ZT21 exista una variabilidad mucho mayor que en resto de puntos de muestreo. También se observa como ZT3 es el punto de muestreo con una mayor similitud de comportamiento entre tejidos, formándose una caja muy estrecha con dos puntos atípicos.

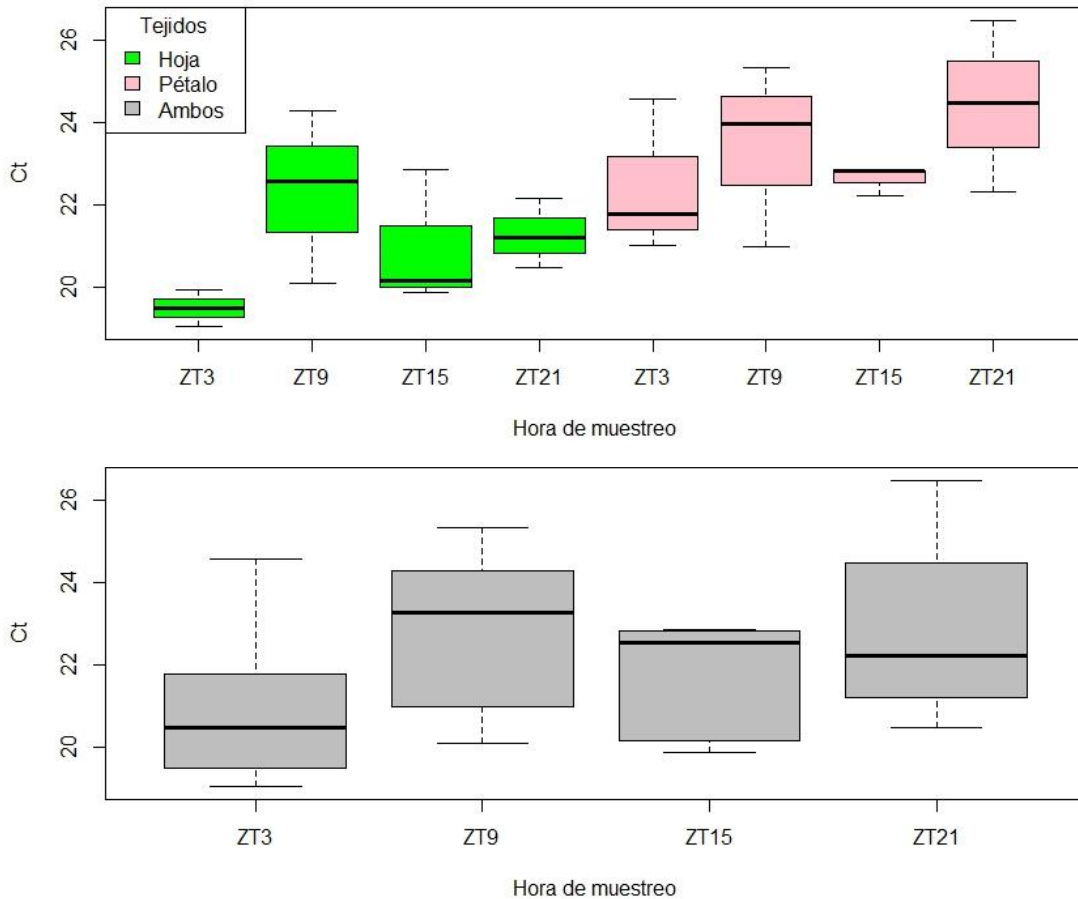


Gráfico 4. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de *CYP* separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo).

En *CYP* las mayores diferencias en cuanto a los niveles de expresión se encuentran en los puntos ZT3 y ZT21, en ambos puntos los valores Ct son mayores en pétalo, traduciéndose en un menor nivel de expresión del gen. En ZT15 también se observan diferencias entre tejidos, aunque menos marcadas. En cambio ZT9 muestra unos niveles de expresión muy similares.

Si se estudian ambos tejidos conjuntamente el hecho de que haya esa diferencia en cuanto a los niveles de expresión en cada tejido hace que haya una gran variabilidad en los puntos ZT3 y ZT21, con bigotes muy largos en ambos casos. En ZT9 y ZT15 estos bigotes son más reducidos, debido a la mayor similitud en cuanto a niveles de expresión del gen.

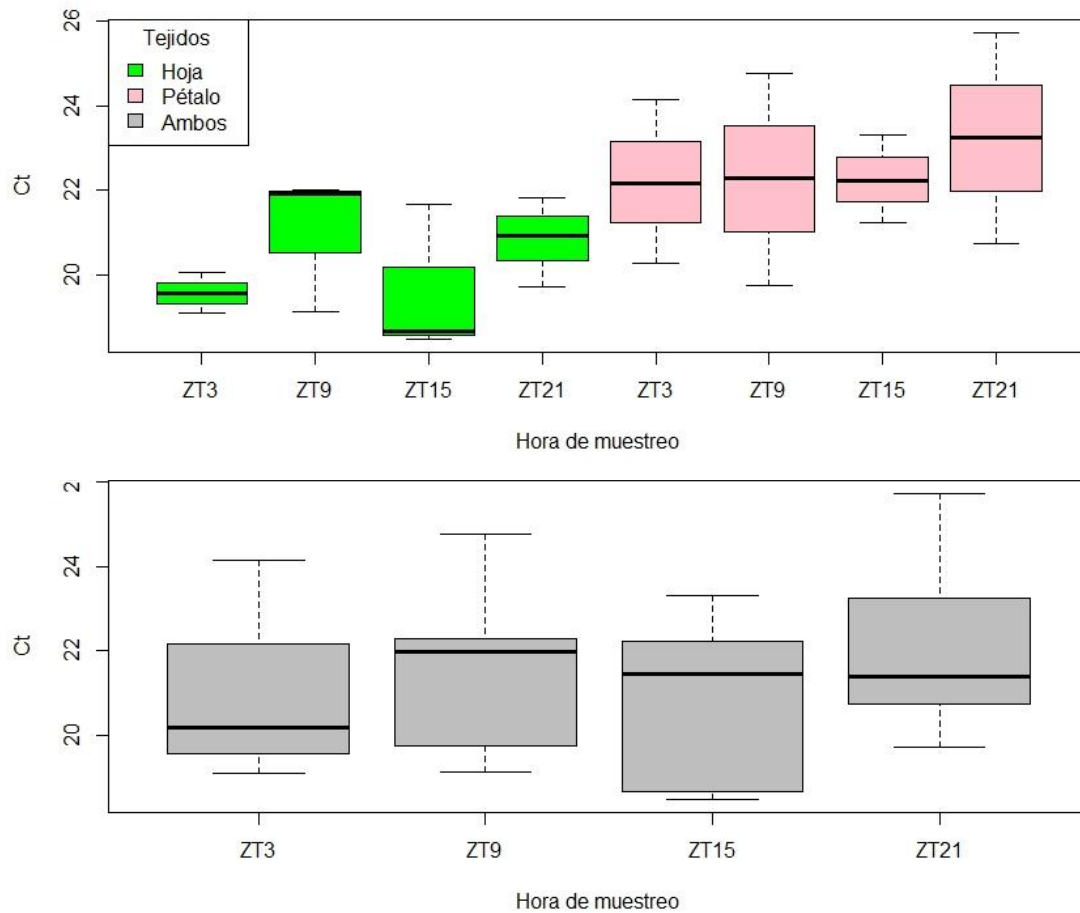


Gráfico 5. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de *EF1 α* separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo).

El Gráfico 5 también muestra diferencias en el comportamiento de *EF1 α* entre tejidos. Mientras que en hoja los niveles de expresión muestran variaciones, en pétalo la mediana de todos los puntos se sitúa en torno a 22 Cts. Aun así, en pétalo hay una mayor dispersión de los valores obtenidos que en hoja.

En cuanto a los niveles de expresión conjuntos de hoja y flor, debido a las diferencias de comportamiento ya comentadas existe una gran variabilidad en todos los puntos de muestreo.

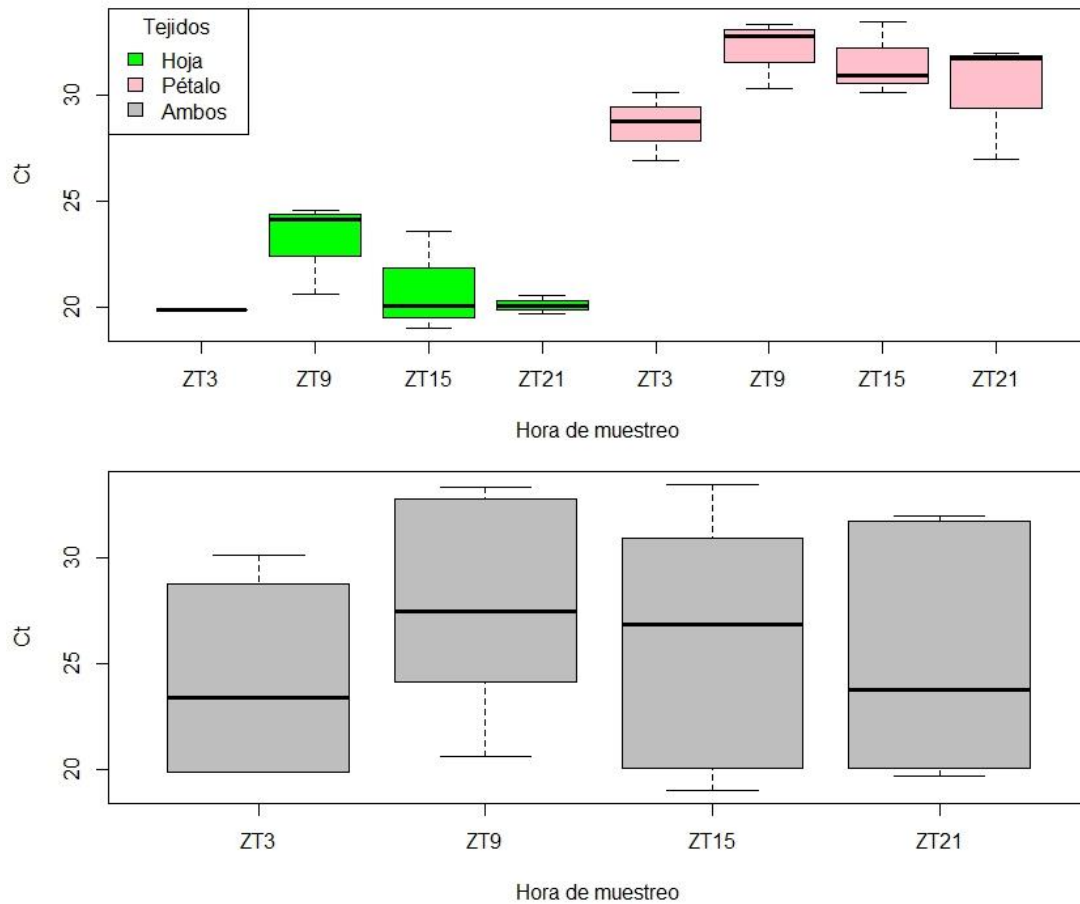


Gráfico 6. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de *GAPDH* separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo).

GAPDH muestra una gran diferencia de expresión entre tejidos, estando mucho más expresado en hoja que en flor.

Este hecho hace que el estudio del comportamiento conjunto de *GAPDH* en pétalo y hoja muestre la mayor variabilidad de los genes de estudio, oscilando los niveles de expresión entre 20 y 30 o más Cts.

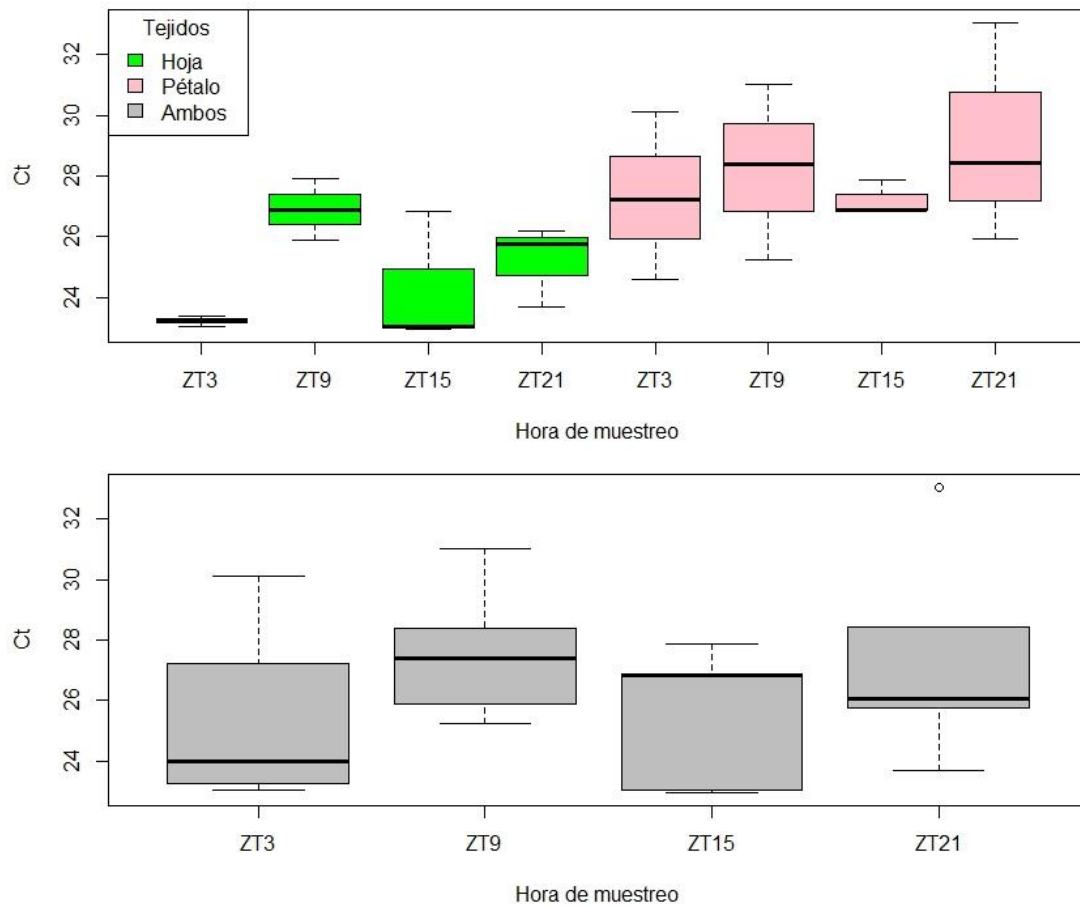


Gráfico 7. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de *RPS13* separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo).

En el diagrama se observa como *RPS13* tiene un comportamiento diferente en hoja y pétalo. En hoja, si analizamos cada punto de muestreo, hay una diferencia entre el valor máximo y mínimo observado menor que en pétalo, sin embargo, hay importantes oscilaciones de los niveles de expresión entre puntos de muestreo, sobre todo de ZT3 a ZT9. En pétalo no existen estas oscilaciones, aunque en general, la diferencia entre el valor máximo y mínimo observado en cada punto es mucho mayor.

Estas diferencias de expresión entre tejidos hacen que estudiando los tejidos conjuntamente exista una gran variabilidad en todos los puntos de muestreo.

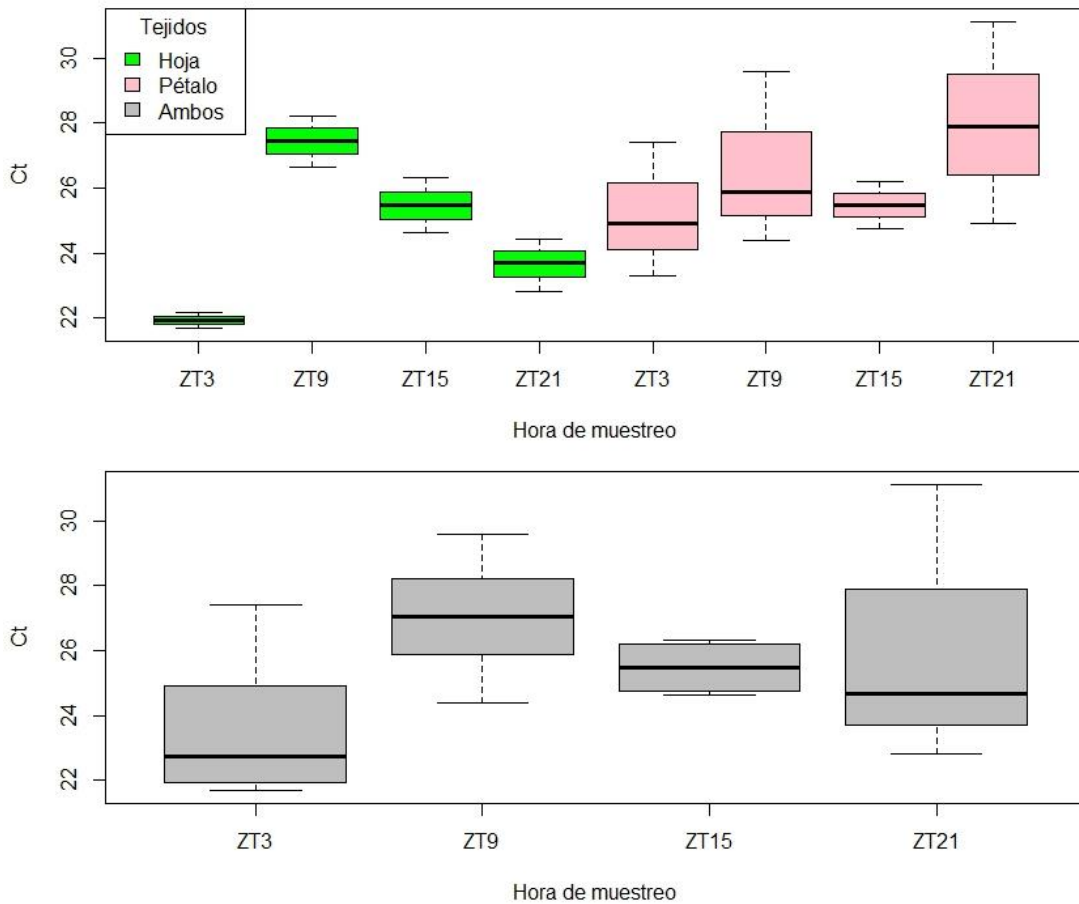


Gráfico 8. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de *RAN1* separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo).

RAN1 muestra tendencias diferentes comparando su comportamiento entre pétalo y hoja. En hoja hay un gran descenso de los niveles de expresión de ZT3 a ZT9, para después volver a aumentar gradualmente en ZT15 y ZT21. En pétalo no hay una variación tan brusca de estos niveles de expresión, aunque hay una mayor diferencia entre el valor máximo y mínimo observado en cada punto de muestreo.

Esta diferencia de comportamiento entre tejidos se traduce en una gran variabilidad en el estudio del comportamiento conjunto.

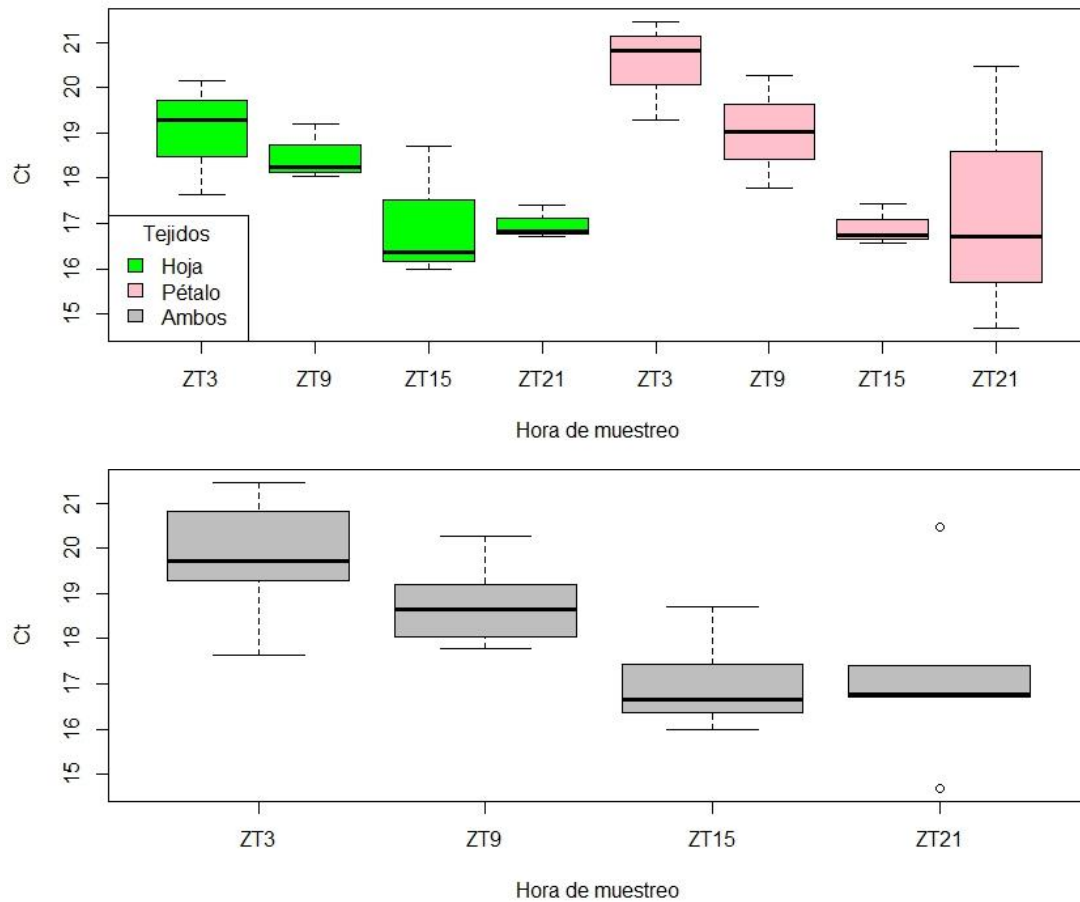


Gráfico 9. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de *UBQ* separando los valores Ct por tejidos (arriba) y tomando las muestras de pétalo y hoja al mismo tiempo (abajo).

En el caso de *UBQ* parece ser el gen con unos mayores niveles de expresión, oscilando sus valores Ct entre 15 y 20 aproximadamente. En cuanto a su estabilidad, tanto en hoja como en pétalo muestra una tendencia a aumentar sus niveles de expresión desde ZT3 a ZT21, siendo esta tendencia mucho más marcada en pétalo.

Analizando su expresión de forma conjunta se observa la misma tendencia a subir sus niveles de expresión.

El Gráfico 10 muestra la variabilidad de los genes de interés en el total de la serie circadiana.

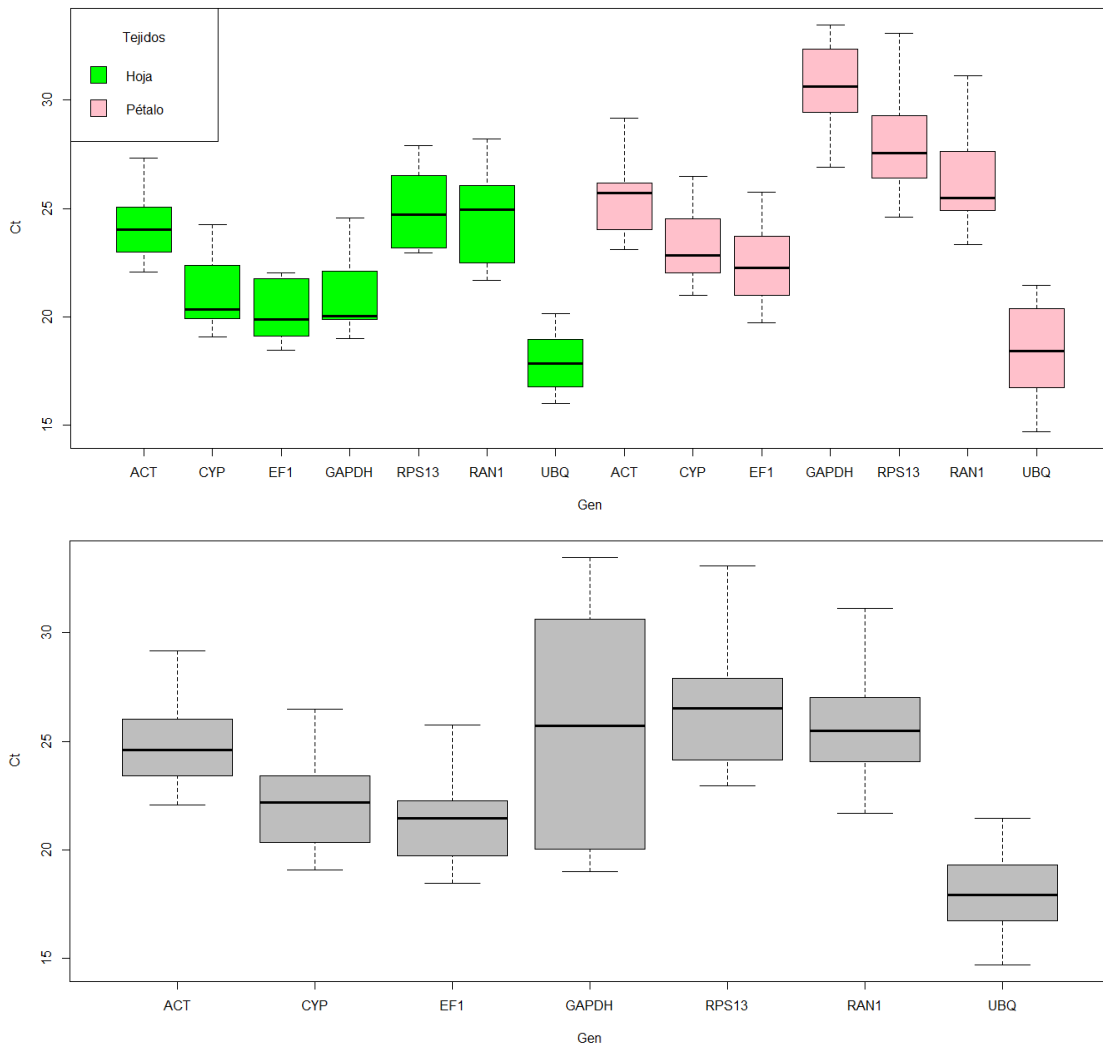


Gráfico 10. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el comportamiento de los genes en estudio separados por tejidos en el total de todos los puntos de muestreo.

En general, todos los genes de interés muestran un comportamiento similar si comparamos ambos tejidos. Destacan sobretodo *GAPDH* y *RPS13*, que muestran un nivel de expresión bastante menor en flor que en hoja, siendo esta diferencia mucho más marcada en *GAPDH*.

Esta diferencia de expresión hace que analizando ambos tejidos conjuntamente *GAPDH* y *RPS13* sean los dos genes con una mayor variabilidad.

5.3.- Análisis estadístico

La Tabla 11 muestra la media, varianza, desviación típica y coeficiente de variación de cada gen de interés en muestras de pétalo.

Tabla 11. Estudio estadístico de los valores Ct por gen en pétalo.

Valor estadístico	<i>ACT</i>	<i>CYP</i>	<i>EF1α</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RPS13</i>	<i>RAN1</i>	<i>UBQ</i>
Media	25,402	23,232	22,488	30,622	27,973	26,321	18,437
Varianza	3,198	3,004	3,361	4,988	6,014	5,129	4,379
Desviación típica	1,788	1,733	1,833	2,233	2,452	2,265	2,093
Coefficiente de variación (%)	7,040	7,460	8,153	7,294	8,767	8,604	11,350

En pétalo los valores Ct más altos los tienen *GAPDH*, *RPS13* y *RAN1*, con una media de 30,622, 27,973 y 26,321 respectivamente. Los más bajos los muestra *UBQ*, con una media de 18,437. En cuanto a la estabilidad del gen, *ACT* es el más estable con un coeficiente de variación de 7,04 %, mientras que el menos estable es *UBQ* con un 11,35 %.

La Tabla 12 muestra la media, varianza, desviación típica y coeficiente de variación de cada gen de interés en muestras de hoja.

Tabla 12. Estudio estadístico de los valores Ct por gen en hoja.

Valor estadístico	<i>ACT</i>	<i>CYP</i>	<i>EF1α</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RPS13</i>	<i>RAN1</i>	<i>UBQ</i>
Media	24,210	21,014	20,252	20,977	24,906	24,622	17,881
Varianza	2,644	2,566	1,825	3,720	3,400	4,826	1,673
desviación típica	1,626	1,602	1,351	1,929	1,844	2,197	1,294
Coefficiente de variación (%)	6,717	7,622	6,671	9,195	7,403	8,922	7,234

En hoja los valores Ct más altos los tienen *RPS13*, *RAN1* y *ACT* con una media de 24,906, 24,622 y 24,210 respectivamente. El menor valor Ct lo tiene *UBQ*, con una media de 17,881. La mayor estabilidad la tienen *EF1 α* y *ACT*, con un coeficiente de variación de 6,671 % y 6,717 % respectivamente. El gen menos estable es *GAPDH*, con un 9,195 %.

La Tabla 13 muestra una comparación de los niveles de expresión entre hoja y flor.

Tabla 13. Comparación de los niveles de expresión entre tejidos.

Nivel de expresión	<i>ACT</i>	<i>CYP</i>	<i>EF1α</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RPS13</i>	<i>RAN1</i>	<i>UBQ</i>
Media Flor	25,402	23,232	22,488	30,622	27,973	26,321	18,437
Media Hoja	24,210	21,014	20,252	20,977	24,906	24,622	17,881
Incremento en %	4,92	10,56	11,04	45,97	12,31	6,90	3,11

Si se compara el nivel de expresión del mismo gen entre tejidos, en todos los genes los valores Ct aumentan en pétalo, esto se traduce en un menor nivel de expresión. El mayor aumento lo tiene *GAPDH*, con un 45,97 %, mientras que *UBQ* es el que menos varía, con un 3,11 %.

La Tabla 14 muestra la media, varianza, desviación típica y coeficiente de variación de cada gen de interés tomando en cuenta ambos tejidos.

Tabla 14. Estudio estadístico de los valores Ct por gen.

Valor estadístico	<i>ACT</i>	<i>CYP</i>	<i>EF1α</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RPS13</i>	<i>RAN1</i>	<i>UBQ</i>
Media	24,806	22,123	21,370	25,799	26,439	25,472	18,159
Varianza	3,165	3,947	3,785	28,436	6,956	5,619	2,975
Desviación típica	1,779	1,987	1,945	5,333	2,637	2,370	1,725
Coefficiente de variación (%)	7,172	8,980	9,104	20,670	9,976	9,306	9,498

Los genes *RPS13*, *GADPH* y *RAN1* tienen los valores Ct más altos, con una media de 26,439, 25,799 y 25,472 respectivamente. En cambio, el valor Ct más bajo lo muestra *UBQ*, con una media de 18,159. En cuanto a la estabilidad del gen, *ACT* es el más estable, con un coeficiente de variación de 7,172 %, mientras que *GAPDH* es el menos estable con un 20,67 %.

5.4.- Análisis por Bestkeeper

Los Gráficos 11 y 12 muestran la clasificación de los genes más estables por Bestkeeper.

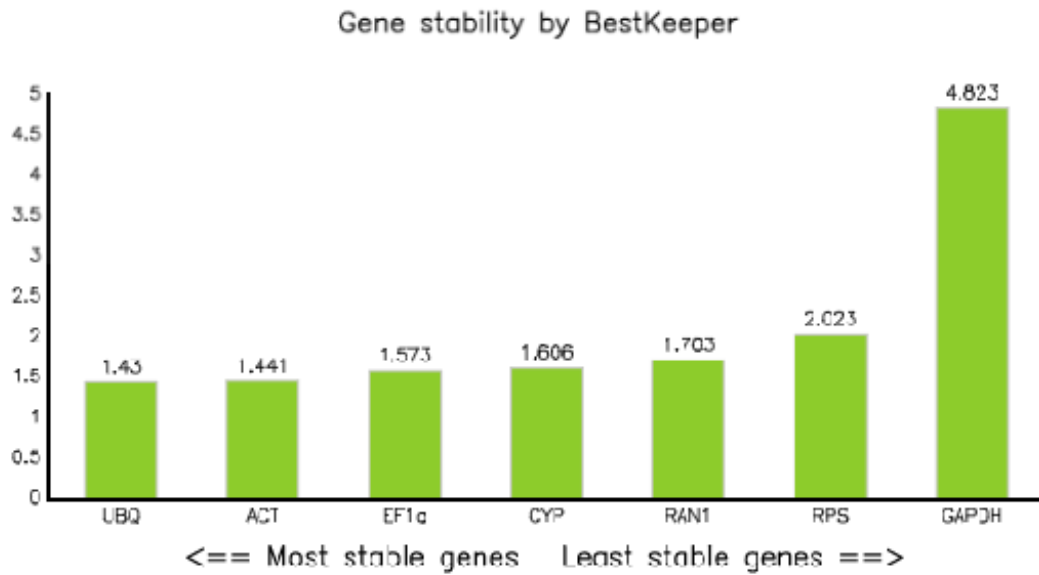


Gráfico 11. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Bestkeeper de los genes en estudio de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha).

Según Bestkeeper, los genes más estables son *UBQ* y *ACT*, mientras que los menos estables son *RPS13y*, con una marcada diferencia, *GAPDH*.

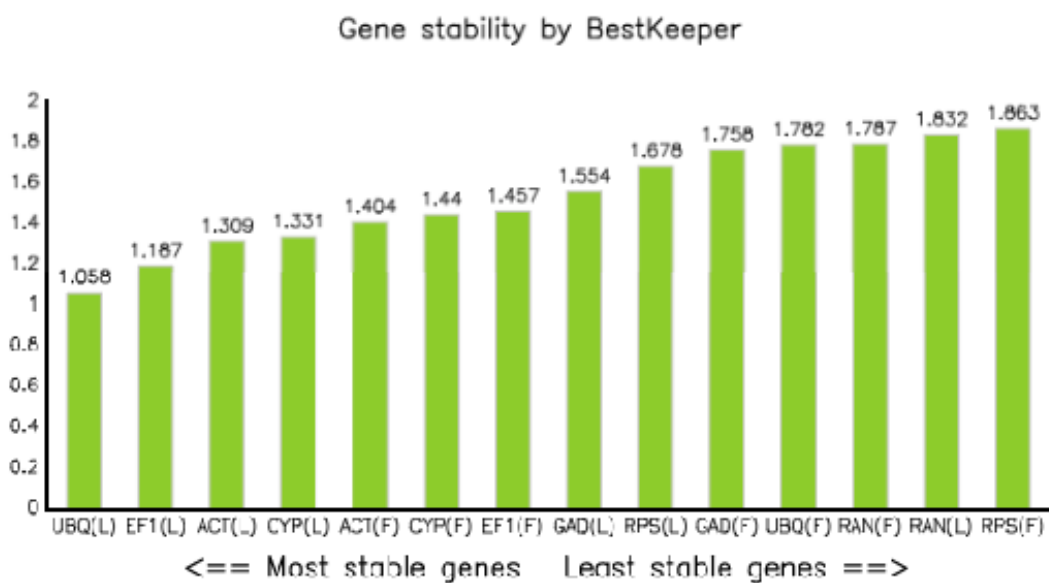


Gráfico 12. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Bestkeeper de los genes en estudio separados por tejidos de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés *leave*).

Si se separan los genes por tejidos, los más estables en pétalo son *ACT*, *CYP* y *EF1α*, aunque estos genes son menos estables que los genes más estables en hoja. Los más estables en hoja son *UBQ*, *EF1α*, *ACT* y *CYP*.

5.5.- Análisis por Normfinder

Los Gráficos 13 y 14 muestran la clasificación de los genes más estables por Normfinder.

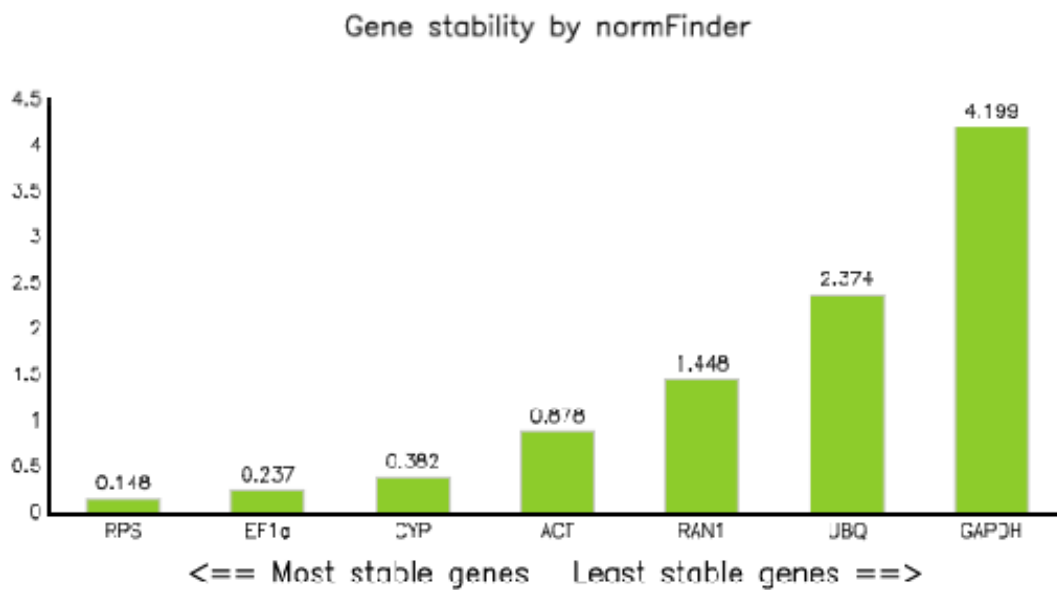


Gráfico 13. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Normfinder de los genes en estudio de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha).

Según Normfinder, los genes más estables son *RPS13*, *EF1α* y *CYP*, mientras que los menos estables son *RAN1*, *UBQ* y *GAPDH*.

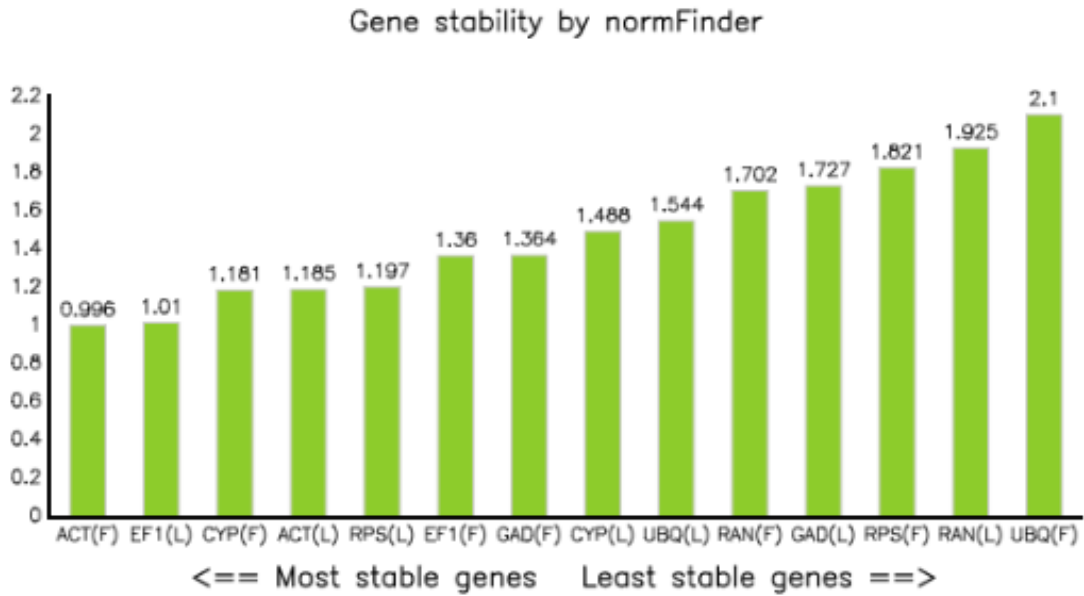


Gráfico 14. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Normfinder de los genes en estudio separados por tejidos de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés *leave*). Por motivos de espacio dentro del gráfico algunos nombres de los genes se han acortado, pasando *EF1α* a *EF1*, *GAPDH* a *GAD* y *RPS13* a *RPS*.

Si se estudia el comportamiento de los genes separados por tejidos, en pétalo los genes más estables son *ACT*, *CYP* y *EF1α*, mientras que los menos estables son *RAN1*, *RPS13* y *UBQ*. En hoja los más estables son *EF1α*, *ACT* y *RPS13*, mientras que los menos estables son *UBQ*, *GAPDH* y *RAN1*.

5.6.- Análisis por Genorm

Los Gráficos 15 y 16 muestran la clasificación de los genes más estables por Genorm.

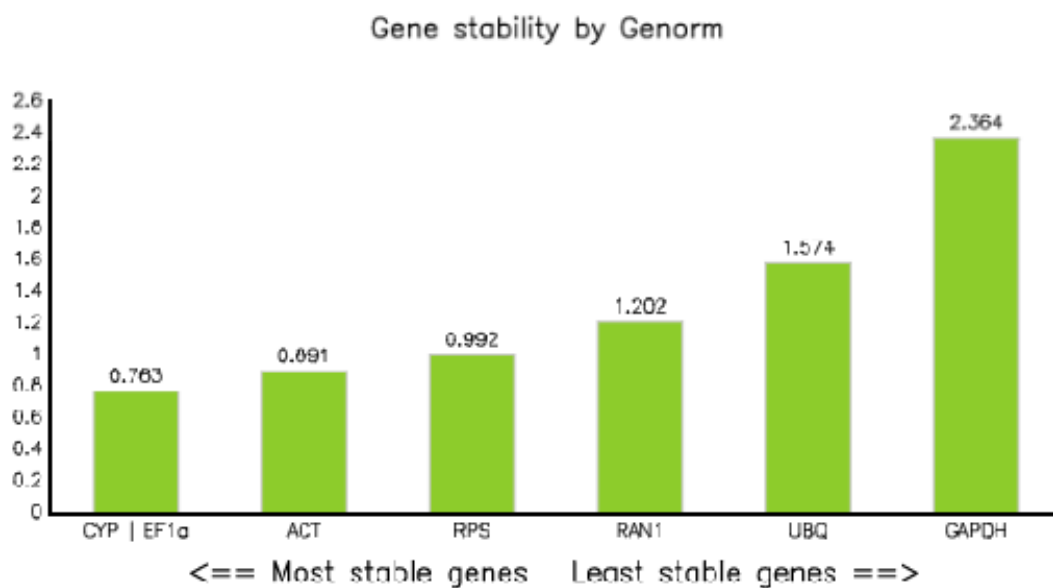


Gráfico 15. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Genorm de los genes en estudio de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha).

En este caso, según Genorm los genes más estables son *CYP*, *EF1 α* (igualados en el primer puesto) y *ACT*, mientras que los menos estables son *UBQ* y *GAPDH*.



Gráfico 16. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por Genorm de los genes en estudio separados por tejidos de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés *leave*). Por motivos de espacio dentro del gráfico algunos nombres de los genes se han acortado, pasando *EF1 α* a *EF1*, *GAPDH* a *GAD* y *RPS13* a *RPS*.

Si se estudia su comportamiento en pétalo y hoja, los genes más estables en pétalo son *ACT*, *CYP* (también igualados en el primer puesto) *EF1 α* y *RAN1*, mientras que el menos estable es *UBQ*. En hoja los más estables son *EF1 α* , *RPS13* y *ACT*, aunque la mayoría de los genes estudiados en flor son más estables que estos tres en hoja, mientras que los menos estables son *GAPDH*, *UBQ* y *RAN1*.

5.7.- Análisis por el método ΔCt

Los Gráficos 17 y 18 muestran la clasificación de los genes más estables por el método ΔCt .

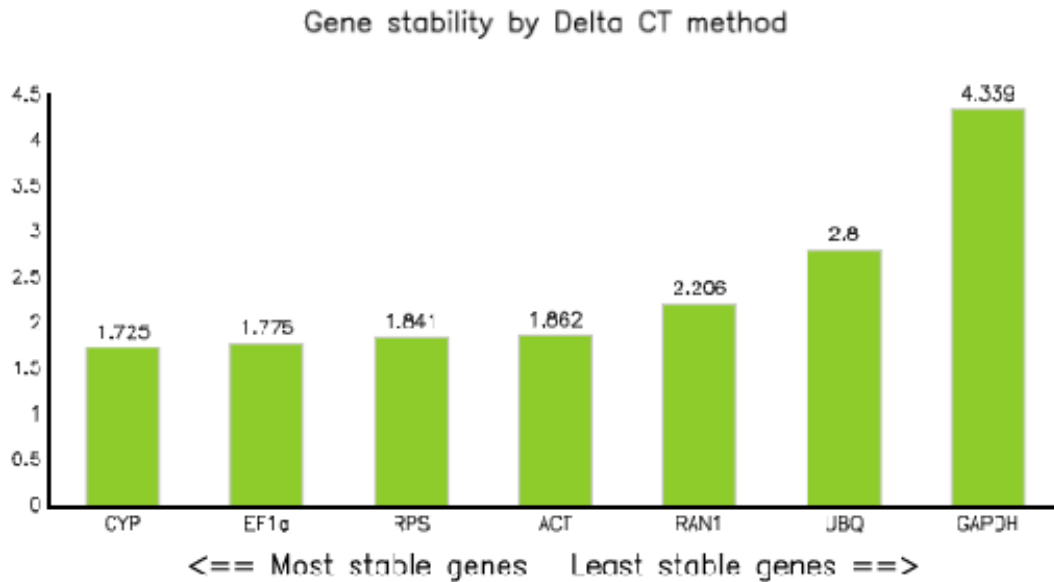


Gráfico 17. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por el método ΔCt de los genes en estudio de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha).

En este caso los genes más estables son *CYP*, *EF1 α* y *RPS13*, mientras que los menos estables son *UBQ* y *GAPDH*.

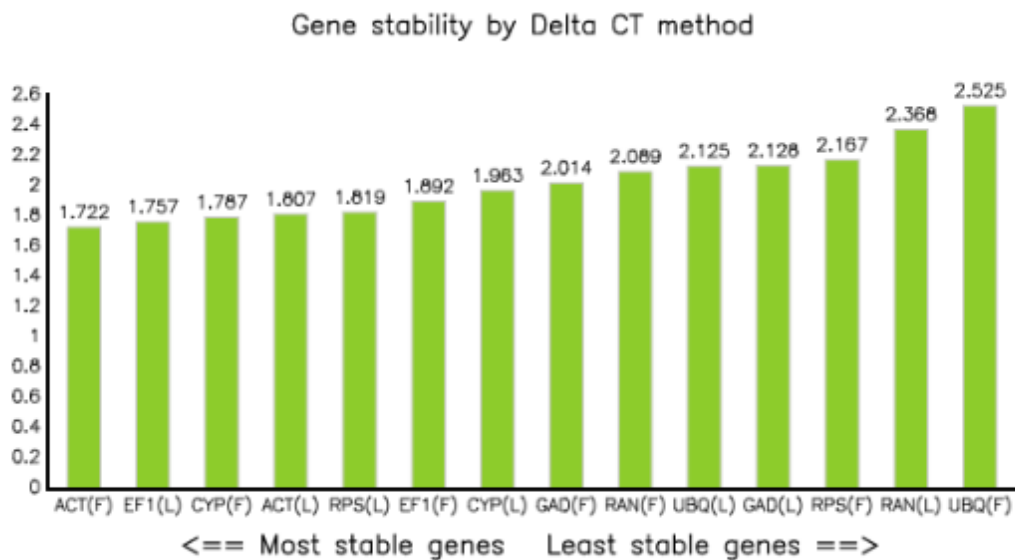


Gráfico 18. Gráfico de barras donde se muestra la clasificación hecha por el método ΔCt de los genes en estudio separados por tejidos de los más estables (izquierda) a los menos estables (derecha). La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés *leave*). Por motivos de espacio dentro del gráfico algunos nombres de los genes se han acortado, pasando *EF1 α* a *EF1*, *GAPDH* a *GAD* y *RPS13* a *RPS*.

En pétalo los genes más estables son *ACT*, *CYP* y *EF1 α* , siendo *RPS13* y *UBQ* los menos estables. Mientras que en hoja los más estables son *EF1 α* , *ACT* y *CYP* y los menos estables *GAPDH* y *RAN1*.

5.8.- Análisis por Reffinder

Como ya se ha comentado anteriormente, Reffinder realiza un análisis de los genes más estables basándose en los resultados obtenidos por Bestkeeper, Normfinder, Genorm y el método ΔCt . En los Gráficos 19 y 20 se muestra esta clasificación.

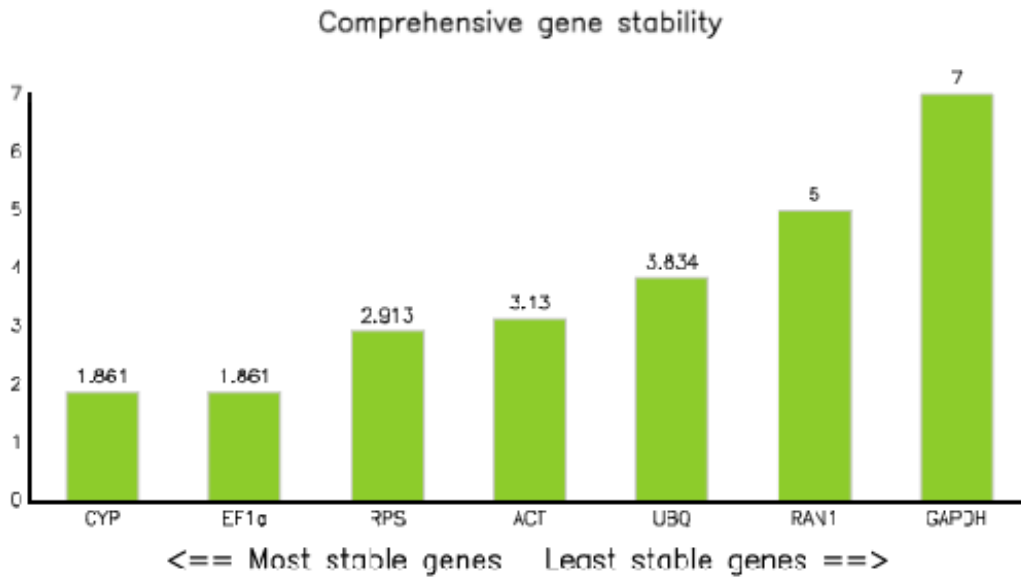


Gráfico 19. Clasificación de los genes más estables por Reffinder.

Según Reffinder los genes más estables son *CYP*, *EF1 α* y *RPS13*, siendo los menos estables *RAN1* y *GAPDH*.

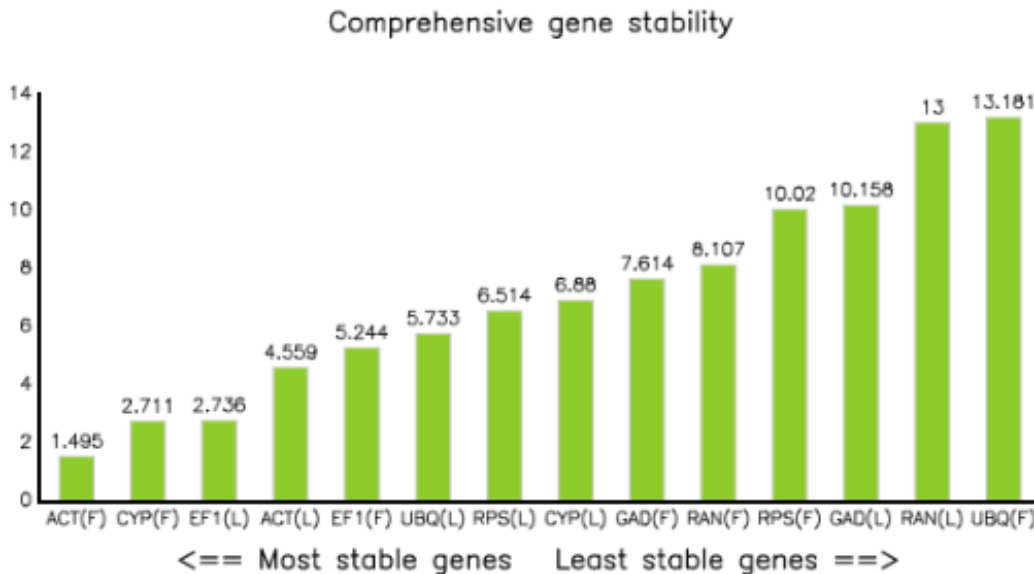


Gráfico 20. Clasificación de los genes más estables por Reffinder según tejidos. La (F) indica muestras de pétalo mientras que (L) indica muestras de hoja (en inglés *leave*). Por motivos de espacio dentro del gráfico algunos nombres de los genes se han acortado, pasando *EF1 α* a *EF1*, *GAPDH* a *GAD* y *RPS13* a *RPS*.

Según tejidos, para pétalo los genes más estables son *ACT*, *CYP* y *EF1a* mientras que los menos estables son *RPS13* y *UBQ*. Para hoja los más estables son *EF1a*, *ACT* y *UBQ*, mientras que los menos estables son *GAPDH* y *RAN1*.

5.9.- Discusión de los resultados

Un reciente estudio realizado en lechuga (*Lactuca sativa*) estudió la expresión de una serie de genes desde dos marcos temporales diferentes, el del desarrollo de la planta y en un periodo de 24 horas, es decir, en series circadianas. Los resultados obtenidos en este ensayo, donde se analizó la expresión de estos genes mediante la técnica de RT-qPCR, indicaban que en ambos casos eran los mismos tres genes (*LsP2A-1*, *LsP2AA3* y *LsTIP41*) los más estables en cuanto a sus niveles de expresión [82].

Aun así, los estudios realizados en *Arabidopsis thaliana*, donde los resultados muestran que bajo diferentes situaciones experimentales se necesitan diferentes genes de normalizado [28,83,84] y otro estudio en *Petunia x hybrida* donde, desde el punto de vista del desarrollo de flor y hoja, se obtenían genes de normalizado óptimos diferentes dependiendo de la línea genética estudiada (Mitchell o V30) y del tejido en cuestión [32], ponen de manifiesto la necesidad de la identificación de los genes de normalizado óptimos para cualquier especie, tejido y condición experimental.

En este sentido, estudios recientes han demostrado que genes como *ODORANT1 (ODO1)*, *EMISSION OF BENZENOIDS II (EOBI)* y *EMISSION OF BENZENOIDS I (EOBI)*, todos ellos genes de la familia *MYB* y pertenecientes al reloj circadiano de *P. hybrida* tienen un papel fundamental en la regulación de emisión de olor por parte de la flor [85–87]. También se ha demostrado la influencia del reloj circadiano en la fotosíntesis en *P. hybrida* [57,88] y como el reloj circadiano confiere una ventaja evolutiva a las plantas superiores [89].

Todos estos estudios ponen de manifiesto la importancia de *P. hybrida* como organismo modelo en el estudio del reloj circadiano. La identificación de genes de normalizado óptimos en series circadianas permitirá la utilización de la RT-qPCR como herramienta para el estudio del reloj circadiano o cualquier experimento en el que se utilicen series temporales cercanas a las 24 horas.

6.- Conclusiones

La mayoría de genes estudiados no han tenido el comportamiento deseado en un gen de normalizado, existiendo una cierta variabilidad en su expresión tanto a lo largo de las 24 horas como entre tejidos.

Las herramientas de análisis de la estabilidad utilizadas, Bestkeeper, Normfinder, Genorm y el método ΔCt usan diferentes algoritmos para determinar la estabilidad de cada gen, por lo que el uso de Reffinder facilita la labor de elegir los mejores genes de normalizado al proporcionar una clasificación de los genes en base al resto de herramientas.

Actin-11 ha sido el gen señalado como más estable en pétalo por Bestkeeper, Normfinder, Genorm, el método ΔCt y por la clasificación realizada por Reffinder, por lo que se puede afirmar que, bajo las condiciones del ensayo y entre los genes estudiados, es el gen de normalizado óptimo en pétalo.

También es válido como gen de normalizado en pétalo *Cyclophilin 2*, ya que muestra un comportamiento muy estable según las herramientas de análisis utilizadas, siendo ligeramente menos estable que *Actin-11*.

Elongation factor 1 α es el gen más estable en hoja para Normfinder, Genorm, el método ΔCt y Reffinder y para Bestkeeper el segundo, por lo que se puede calificar este gen como el gen de normalizado óptimo en hoja.

De nuevo *Actin-11* tiene un comportamiento muy estable en hoja, considerándolo el segundo mejor gen de normalizado en hoja, aunque hay una notable diferencia entre la estabilidad de *Elongation factor 1 α* y *Actin-11*.

Otro de los objetivos de este ensayo era el de establecer genes de normalizado que sirviesen tanto para flor como para hoja, en este sentido *Cyclophilin 2* es el más estable en ambos tejidos, seguido por *Elongation factor 1 α* , aunque hay que aclarar que esto no quiere decir que sean genes de normalizado válidos, ya que siempre se conseguirán unos resultados más precisos al utilizar los genes idóneos para cada tejido.

7.- Bibliografía

1. Castanera Andrés R. Estudio de la variación en los niveles de transcripción de genes de enzimas degradadoras de lignina en cultivos sólidos y sumergidos de *Pleurotus ostreatus*. Universidad Pública de Navarra; 2011.
2. Gene Expression Techniques [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://www.news-medical.net/life-sciences/Gene-Expression-Techniques.aspx>
3. Koo J, Kim Y, Kim J, Yeom M, Lee IC, Nam HG. A GUS/luciferase fusion reporter for plant gene trapping and for assay of promoter activity with luciferin-dependent control of the reporter protein stability. *Plant Cell Physiol.* 2007;48:1121–31.
4. Nordgren IK, Tavassoli A. A bidirectional fluorescent two-hybrid system for monitoring protein–protein interactions. *Mol. Biosyst.* [Internet]. Royal Society of Chemistry; 2014 [cited 2017 Apr 4];10:485. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3mb70438f>
5. Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. *Genética*. 9th ed. S.A. MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA; 2008.
6. Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 1982;79:4381–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6812046><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC346675>
7. Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* [Internet]. 2008;6:339–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1888>
8. Taub EF, Deleo JM, Brad T. Sequential Comparative Hybridizations Analyzed by. *Dna.* 1983;2:309–27.
9. Introduction to Gene Expression: Getting Started Guide [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/what-can-you-do-with-qpcr/introduction-to-gene-expression.html>
10. Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning : a laboratory manual* [Internet]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001 [cited 2017 Mar 15]. Available from: <http://trove.nla.gov.au/work/13615226?q&versionId=45739910>
11. Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD, Kushnirov V V. Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *J. Biol. Chem.* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2003 [cited 2017 Mar 22];278:49636–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507919>
12. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick RM. *Molecular biology of the gene*. 7th ed. 2013.
13. Bustin SA. Real-Time PCR. *Encycl. Diagnostic Genomics Proteomics* [Internet]. 2005;1117–25. Available from: <http://www.gene-quantification.com/bustin-qpcr-review-2005.pdf>
14. Bioinformatics B, Alvarez MJ, Vila-Ortiz GJ, Salibe MC, Podhajcer OL, Pitossi FJ. Model based analysis of real-time PCR data from DNA binding dye protocols. [cited 2017 Mar 20]; Available from: http://download.springer.com/static/pdf/615/art%253A10.1186%252F1471-2105-8-85.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fbmcbioinformatics.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2F1471-2105-8-85&token2=exp=1490025520~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F615%2Fart%25253A10.1186%25252F1471-2105-8-85.pdf*~hmac=a301e5dfaa1b64d8f0f680c228ddc83536b5e1e48c553d5649644b6e9a20d721

15. Lalam N. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *J. Theor. Biol.* [Internet]. 2006 [cited 2017 Mar 20];242:947–53. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519306002281>
16. Absolute vs. Relative Quantification for qPCR [Internet]. [cited 2017 Apr 5]. Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/absolute-vs-relative-quantification-for-qpcr.html>
17. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 1999;96:9236–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=17763&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. Oxford University Press; 2001 [cited 2017 Mar 20];29:45e–45. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.9.e45>
19. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* [Internet]. 2008;3:1101–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2008.73>
20. Artico S, Nardeli SM, Brilhante O, Grossi-De-Sa MF, Alves-Ferreira M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. 2010 [cited 2017 Apr 18]; Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/49>
21. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* [Internet]. 2002 [cited 2017 Apr 18];29:23–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200227>
22. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* [Internet]. 2005 [cited 2017 Apr 18];39:75–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16060372>
23. Ma S, Niu H, Liu C, Zhang J, Hou C, Wang D. Expression Stabilities of Candidate Reference Genes for RT-qPCR under Different Stress Conditions in Soybean. Mills K, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2013 [cited 2017 Apr 18];8:e75271. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0075271>
24. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* [Internet]. 2006 [cited 2017 Apr 18];1:1559–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406449>
25. Wan H, Zhao Z, Qian C, Sui Y, Malik AA, Chen J. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Anal. Biochem.* [Internet]. 2010 [cited 2017 Apr 18];399:257–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005862>
26. Gutierrez L, Mauriat M, Gunin S, Pelloux J, Lefebvre J-F, Louvet R, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol. J.* [Internet]. 2008 [cited 2017 Apr 18];6:609–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18433420>
27. Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Van Wuytswinkel O. Towards a systematic validation of references in real-time rt-PCR. *Plant Cell* [Internet]. American Society of Plant Biologists; 2008 [cited 2017 Apr 18];20:1734–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18664615>
28. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *PLANT Physiol.* [Internet]. 2005 [cited 2017 Apr 18];139:5–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166256>
29. Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [Internet]. 2006 [cited 2017 Apr 18];345:646–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690022>

30. Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol.* [Internet]. 2008 [cited 2017 Apr 18];8:131. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19102748>
31. Nicot N. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* [Internet]. 2005 [cited 2017 Apr 18];56:2907–14. Available from: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/eri285>
32. Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biol.* 2010;10:4.
33. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* [Internet]. 2002;3:RESEARCH0034. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC126239>
34. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64:5245–50.
35. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 2004;26:509–15.
36. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* [Internet]. BioMed Central; 2007 [cited 2017 Apr 19];8:R19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17291332>
37. Tello ML. Alteraciones en nascencia y enraizamiento de algunas plantas ornamentales de la comunidad de Madrid. Universidad Politécnica de Madrid; 1998.
38. Sullivan TD. Somatic Chromosomes of Pedigreed Hybrid *Petunia*. *Bull. Torrey Bot. Club.* 2016;74:453–75.
39. Bombarely A, Moser M, Amrad A, Bao M, Bapaume L, Barry CS, et al. Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nat. Plants* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2017 Apr 4];2:16074. Available from: <http://www.nature.com/articles/nplants201674>
40. *Petunia hybrida* [Internet]. 2017. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <https://www.floresyplantas.net/petunia-hybrida/>
41. Sink K. *Petunia: Monographs on theoretical and applied genetics* [Internet]. 1984 [cited 2017 Feb 20]. Available from: https://scholar.google.es/scholar?q=Petunia%3A+Monographs+on+theoretical+and+applied+genetics&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5
42. Vandebussche M, Chambrier P, Rodrigues Bento S, Morel P. *Petunia, Your Next Supermodel?* *Front. Plant Sci.* [Internet]. 2016;7:1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00072/abstract>
43. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell.* 1990;2:279–89.
44. van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell.* 1990;2:291–9.
45. Holton T, Cornish E. Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Cell.* 1995;7:1071–83.

46. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 2001;126:485–93.
47. Mascarenhas JP. Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell* [Internet]. 1993;5:1303–14. Available from: <http://www.plantcell.org>
48. Angenent GC, Franken J, Busscher M, Colombo L, van Tunen AJ. Petal and stamen formation in petunia is regulated by the homeotic gene *fbp1*. *Plant J.* 1993. p. 101–12.
49. Souer E, Van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R. The no apical Meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell.* 1996;85:159–70.
50. Flavell RB. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994;91:3490–6.
51. Matzke AJM, Neuhuber F, Park YD, Ambros PF, Matzke MA. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *MGG Mol. Gen. Genet.* 1994;244:219–29.
52. Finnegan E. J., Genger RK, Peacock W. J., Dennis ES. Dna Methylation in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* [Internet]. 1998;49:223–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012234>
53. Herrero M, Dickinson HG. Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *J. Cell Sci.* [Internet]. 1979;36:1–18. Available from: <http://jcs.biologists.org/content/36/1/1.abstract>
54. Clark KR, Okuley JJ, Collins PD, Sims TL. Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-incompatible and pseudo-self-compatible petunia. *Plant Cell.* 1990;2:815–26.
55. Strommer J, Peters J, Zethof J, De Keukeleire P, Gerats T. AFLP maps of *Petunia hybrida*: Building maps when markers cluster. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105:1000–9.
56. PETUNIA AS A research model [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: http://flower.ens-lyon.fr/PetuniaPlatform/Petunia_as_a_model.html
57. Stayton MM, Brosio P, Dunsmuir P. Photosynthetic Genes of *Petunia* (Mitchell) Are Differentially Expressed during the Diurnal Cycle. *PLANT Physiol.* [Internet]. 1989 [cited 2017 Apr 21];89:776–82. Available from: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.89.3.776>
58. Verdonk JC, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink RC. Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry* [Internet]. 2003 [cited 2017 Apr 21];62:997–1008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12590126>
59. Gerats T, Vandenbussche M. A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends Plant Sci.* 2005;10:251–6.
60. Bar-Joseph Z. Analyzing time series gene expression data. *Bioinformatics* [Internet]. Oxford University Press; 2004 [cited 2017 Apr 24];20:2493–503. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bth283>
61. Bar-Joseph Z, Gitter A, Simon I. Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. *Nat. Rev. Genet.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2017 Apr 24];13:552–64. Available from: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/nrg3244>
62. Fabiola Hernández-Rosas JSG. Ritmos circadianos, genes reloj y cáncer. *Arch. Med.* [Internet]. iMedPub; [cited 2017 Apr 21]; Available from: <http://www.archivosdemedicina.com/medicina-de-familia/ritmos-circadianos-genes-reloj-y-cncer.php?aid=826>

63. Gutiérrez RA, Stokes TL, Thum K, Xu X, Obertello M, Katari MS, et al. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. National Academy of Sciences; 2008 [cited 2017 Apr 21];105:4939–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18344319>
64. Haydon MJ, Mielczarek O, Robertson FC, Hubbard KE, Webb AAR. Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Nature* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 21];502:689–92. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12603>
65. Salomé PA, Weigel D, McClung CR. The role of the *Arabidopsis* morning loop components CCA1, LHY, PRR7, and PRR9 in temperature compensation. *Plant Cell* [Internet]. American Society of Plant Biologists; 2010 [cited 2017 Apr 21];22:3650–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098730>
66. Jarillo JA, Piñeiro MA. The molecular basis of photoperiodism. *Biol. Rhythm Res.* [Internet]. Taylor & Francis ; 2006 [cited 2017 Apr 21];37:353–80. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09291010600804619>
67. McClung CR. Plant circadian rhythms. *Plant Cell* [Internet]. American Society of Plant Biologists; 2006 [cited 2017 Apr 24];18:792–803. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595397>
68. Capel J, Lozano R, Martínez-Zapater JM, Jarillo JA. Ritmos y relojes circadianos de las plantas. *Ecosistemas Enero* [Internet]. 2003 [cited 2017 Apr 24];12. Available from: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=234>
69. McClung CR. Beyond *Arabidopsis*: The circadian clock in non-model plant species. *Semin. Cell Dev. Biol.* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 21];24:430–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952113000256>
70. Para A, Farré EM, Imaizumi T, Pruneda-Paz JL, Harmon FG, Kay SA. PRR3 Is a vascular regulator of TOC1 stability in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* [Internet]. American Society of Plant Biologists; 2007 [cited 2017 Apr 21];19:3462–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055606>
71. Takata N, Saito S, Saito CT, Uemura M. Phylogenetic footprint of the plant clock system in angiosperms: evolutionary processes of Pseudo-Response Regulators. *BMC Evol. Biol.* [Internet]. 2010 [cited 2017 Apr 21];10. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/126>
72. Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay SA. Reciprocal Regulation Between TOC1 and LHY/CCA1 Within the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Science* (80-.). [Internet]. 2001 [cited 2017 Apr 21];293. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/293/5531/880>
73. Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, et al. The ELF4–ELF3–LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* [Internet]. 2011 [cited 2017 Apr 21];475. Available from: <https://www.nature.com/nature/journal/v475/n7356/pdf/nature10182.pdf>
74. Park DH, Somers DE, Kim YS, Choy YH, Lim HK, Soh MS, et al. Control of Circadian Rhythms and Photoperiodic Flowering by the *Arabidopsis* GIGANTEA Gene. *Science* (80-.). [Internet]. 1999 [cited 2017 Apr 24];285. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/285/5433/1579>
75. Fowler S, Lee K, Onouchi H, Samach A, Richardson K, Morris B, et al. GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* [Internet]. 1999 [cited 2017 Apr 24];18:4679–88. Available from: <http://emboj.embopress.org/content/embojnl/18/17/4679.full.pdf>
76. Navarro P, Fernández C, Weiss J, Egea-Cortines M. Development of a Configurable Growth Chamber with a Computer Vision System to Study Circadian Rhythm in Plants. *Sensors* [Internet]. 2012 [cited 2017 Apr 21];12:15356–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202214>
77. SGN - Home Page [Internet]. [cited 2017 Apr 11]. Available from: <https://solgenomics.net>
78. TAIR - Home Page [Internet]. [cited 2017 Apr 11]. Available from: <https://www.arabidopsis.org/>

79. Box MS, Coustham V, Dean C, Mylne JS. Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from Arabidopsis. Plant Methods [Internet]. 2011;7:7. Available from: <http://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-7-7%5Cnhttp://download.springer.com.sicd.clermont-universite.fr/static/pdf/356/art:10.1186/1746-4811-7-7.pdf?originUrl=http://link.springer.com/article/10.1186/1746-4811-7-7&token2=exp=1460>
80. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. BMC Mol. Biol. [Internet]. 2006;7:33. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/7/33>
81. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. Plant Mol. Biol. 2012;80:75–84.
82. Sgamma T, Pape J, Massiah A, Jackson S. Selection of reference genes for diurnal and developmental time-course real-time PCR expression analyses in lettuce. Plant Methods [Internet]. BioMed Central; 2016 [cited 2017 Apr 20];12:21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27011764>
83. Remans T, Smeets K, Opendakker K, Mathijsen D, Vangronsveld J, Cuypers A. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in Arabidopsis thaliana exposed to increased metal concentrations. Planta [Internet]. Springer-Verlag; 2008 [cited 2017 Apr 20];227:1343–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-008-0706-4>
84. Lilly ST, Drummond RSM, Pearson MN, MacDiarmid RM. Identification and Validation of Reference Genes for Normalization of Transcripts from Virus-Infected *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant-Microbe Interact. [Internet]. The American Phytopathological Society ; 2011 [cited 2017 Apr 20];24:294–304. Available from: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-10-10-0236>
85. Verdonk JC, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink RC. ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. Plant Cell [Internet]. American Society of Plant Biologists; 2005 [cited 2017 Apr 25];17:1612–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805488>
86. Spitzer-Rimon B, Marhevka E, Barkai O, Marton I, Edelbaum O, Masci T, et al. *EOBII*, a Gene Encoding a Flower-Specific Regulator of Phenylpropanoid Volatiles' Biosynthesis in Petunia. Plant Cell [Internet]. 2010 [cited 2017 Apr 25];22:1961–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20543029>
87. Spitzer-Rimon B, Farhi M, Albo B, Cna'ani A, Ben Zvi MM, Masci T, et al. The R2R3-MYB-like regulatory factor EOBI, acting downstream of EOBII, regulates scent production by activating ODO1 and structural scent-related genes in petunia. Plant Cell [Internet]. American Society of Plant Biologists; 2012 [cited 2017 Apr 25];24:5089–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23275577>
88. Hennessey TL, Field CB. Circadian Rhythms in Photosynthesis : Oscillations in Carbon Assimilation and Stomatal Conductance under Constant Conditions. Plant Physiol. [Internet]. 1991 [cited 2017 Apr 25];96:831–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16668261>
89. Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, et al. Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. Science (80-.). [Internet]. 2005 [cited 2017 Apr 25];309. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/309/5734/630>
90. Green Fluorescent Protein. Proteopedia [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 25]; Available from: [http://www.proteopedia.org/w/Green Fluorescent Protein%26oldid=1834778](http://www.proteopedia.org/w/Green_Fluorescent_Protein%26oldid=1834778)
91. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Internet]. [cited 2017 Apr 26]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
92. basesquimicas: bases nitrogenadas [Internet]. [cited 2017 Apr 25]. Available from: <http://basesnitrogenadas601.blogspot.com.es/2012/05/bases-nitrogenadas.html>
93. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. VM, González Rodríguez AD, Hernández Castro R, Suárez Güemes F, Trigo Tavera FJ, Jaramillo Arango CJ. Veterinaria [Internet]. Vet. México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2011 [cited 2017 Apr 25]. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922011000100001

94. Tipos de PCR [Internet]. [cited 2017 Apr 25]. Available from: <http://apuntesbiologiamol.blogspot.com.es/2014/05/tipos-de-pcr.html>
95. SISTEMAS DE DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR PCR A TIEMPO REAL Guía de interpretación de resultados. [cited 2017 May 8]; Available from: http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf