

# Structure of the leaf and petal circadian clock in petunia

## Estructura del reloj circadiano en hoja y pétalo de petunia

M.I. Terry<sup>1\*</sup>, M. Egea<sup>1</sup>, J. Weiss<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genética Molecular, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202 Cartagena, España.

\*mitl0@upct.alu.es

### **Abstract**

**Organisms from bacteria to humans are subject to periodic oscillations as consequence of terrestrial rotation; the existence of biological clocks allow organisms to anticipate to daily changes. In plants, the circadian clock has been studied only in leaf so there is not much information about its adaptation in other tissues. In the current work, clock genes have been identified and analyzed in petunia leaf and petal, where, among others, changes in expression between both tissues have been observed, suggesting a tissue or organ specific specialization.**

**Keywords:** Biological rhythm; Petunia x hybrida; Solanaceae; qPCR

### **Resumen**

**Los seres vivos, desde bacterias hasta el ser humano, están sujetos a oscilaciones periódicas como consecuencia de la rotación terrestre; la existencia de los relojes biológicos permite a los organismos anticiparse a estos cambios diarios. En plantas, el reloj circadiano ha sido el más estudiado, especialmente en hoja, por lo que no existe mucha información sobre esta adaptación en otros tejidos. En el presente trabajo se han identificado y caracterizado genes del reloj en pétalo y hoja de petunia, donde se ha observado entre otros, cambios a nivel de expresión entre ambos tejidos, lo que sugiere una especialización tejido u órgano específico.**

**Palabras clave:** Petunia x hybrida; Ritmo biológico; Solanácea; qPCR

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los organismos están sujetos a oscilaciones periódicas como consecuencia de la rotación del planeta; y son capaces de anticiparse a esta alternancia del día y la noche. Los relojes biológicos son los responsables de esta adaptación al medio oscilante pero cíclico. De ellos el reloj circadiano, referido a ciclos con una duración de entre 20 y 28 horas, ha sido el más ampliamente estudiado. Este reloj circadiano consta de una serie de bucles interconectados y las plantas no son una excepción. En el modelo Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), sobre el que se han desarrollado la mayor parte de estos estudios, se han descrito tres bucles formados por diversos genes entre los que cabe destacar *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* y la familia *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRRs)* que incluye el gen *TIMING OF CAB EXPRESSION (TOC1)* [1]; además otros genes como *ZEITLUPE (ZTL)*, un receptor de luz azul, y *GIGANTEA (GI)* juegan un papel importante en el reloj.

Aunque se conocen muchas de las piezas que conforman este reloj, el papel de éstas en la regulación de diversos procesos biológicos como el crecimiento y el metabolismo, no es bien conocido. Por otro lado, los estudios anteriormente mencionados se realizaron mayoritariamente

en hoja por lo que este reloj no se conoce bien en otros tejidos y órganos, tales como flores o raíces. En el presente trabajo se empleará la planta modelo petunia (*Petunia x hybrida*).

Petunia pertenece a la familia de las solanáceas, donde se incluyen especies de gran importancia en producción, como el tomate o la patata, y posee un gran interés en horticultura y en investigación. Recientemente su genoma ha sido secuenciado [2] y al igual que otras plantas de la familia, es diploide pero posee una serie de duplicaciones ancestrales del genoma. Además difiere del resto de solanáceas al presentar siete cromosomas frente a doce que presentan tomate o patata..

Este trabajo tiene como objetivos principales identificar, caracterizar y establecer patrones de expresión de los principales genes del reloj en dos tejidos distintos de petunia: hoja y flor.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Las petunias, Mitchell o W115, se germinaron en cámaras de cultivo con condiciones controladas: 16 horas de luz y 8 de oscuridad (o 16L:8D) y 23 y 18 °C durante el día y la noche, respectivamente. Posteriormente, las plantas se llevaron a los invernaderos de la Estación Experimental Agroalimentaria Tomás Ferro. Finalmente, previo al inicio del experimento, las plantas se trasladaron a una cámara de cultivo, esta vez bajo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (12L:12D) con las mismas temperaturas citadas anteriormente y se aclimataron durante una semana. Transcurrido este tiempo, se recogieron a intervalos regulares hojas jóvenes (2-2,5 cm de longitud) y flores de tres días tras la apertura o postantesis de tres plantas distintas; estas muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

### 2.2 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y qPCR

La extracción de ARN (ácido ribonucleico) se realizó siguiendo el protocolo descrito por [3]. Para la síntesis de ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario o copia), se siguió el protocolo especificado por el fabricante (ThermoFisher). Finalmente, la PCR a tiempo real o cuantitativa (*qPCR*) se realizó con el termociclador Mx3000P (Agilent Technologies) siguiendo las especificaciones del fabricante (Clontech) con las siguientes condiciones: 40 ciclos, 95 °C 15", 60 °C 20" y 72 °C 15", tomando *UBIQUITIN (UBI)* como gen de referencia o endógeno. Las secuencias de los cebadores de los genes analizados se recogen en la Tabla 1.

### 2.3 Análisis de datos

Para la detección de ritmos empleamos el paquete RAIN [4], desarrollado en Bioconductor.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los relojes biológicos han sido estudiados en profundidad en pocas plantas, destacando *Arabidopsis*; sin embargo, en los últimos años se han incrementado los trabajos realizados en otras especies, lo que está contribuyendo a mejorar aspectos como la producción y a entender las respuestas de las comunidades vegetales al cambio climático [5].

El reloj descrito en *Arabidopsis* difiere en varios aspectos del reloj de petunia. Primero, los genes *PRR7*, *PRR5* y *GI* están duplicados en petunia, (*PaxiN*): *PaxiNPRR7a*, *PaxiNPRR7b*, *PaxiNPRR5a*, *PaxiNPRR5b*, *PaxiNGI1* y *PaxiNGI2*, el árbol de la familia *PRRs* se recoge en la Fig. 1; además tres de estos genes duplicados mostraron un patrón distinto: el pico de *PaxiNPRR5a*, *PaxiNGI1* y *PaxiNGI2* tuvo lugar a distinta hora en pétalo y hoja. Estas diferencias no solo se observaron en los genes duplicados: *PaxiNPRR9* y *PaxiNFKF* también presentaron máximos en

momentos distintos del día (Fig. 1B, 1C). Por otro lado, aunque la expresión de los genes en hoja de petunia fue similar a la descrita en *Arabidopsis* [1, 6] (Fig. 1A, C); los patrones de expresión en pétalo son los que más difieren, tanto de *Arabidopsis* como de la hoja de petunia (Fig. 1). Finalmente, todos los genes excepto *PaxiNZTL* en hoja, mostraron una expresión rítmica; esto concuerda con lo descrito para el gen *ZTL* [7] que se expresa de manera constitutiva; sin embargo, la expresión en pétalo osciló significativamente ( $p = 2,22e^{-04}$ ). La existencia de relojes periféricos, además de un reloj central, es bien conocida en mamíferos; estudios sugieren que las plantas también presentan relojes específicos en diferentes tejidos, es decir, que la expresión de los genes que conforman el reloj varía entre tejidos [8]. Nuestros datos sugieren una especialización tejido u órgano específica del reloj.

#### 4. CONCLUSIONES

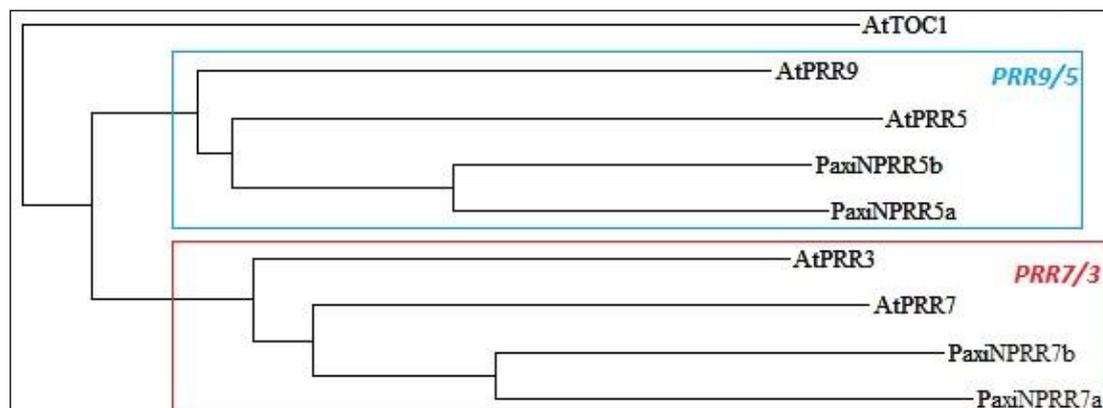
El reloj biológico consta de una serie de genes que regula el desarrollo de los organismos en respuesta al medio. Tanto en animales como en plantas existen estudios que apuntan a una especialización del reloj a nivel de tejido u órgano; los patrones de expresión obtenidos en el presente trabajo en pétalo y hoja de petunia, sumado a la duplicación de algunos de los genes involucrados en el reloj, sugieren que éste puede desempeñar un papel específico en cada tejido.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

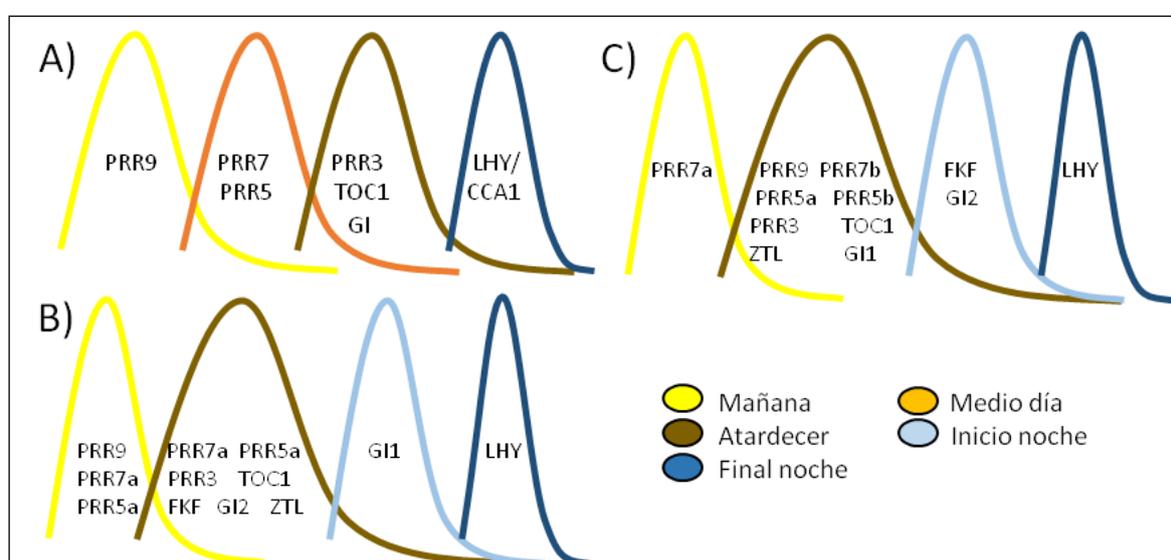
Este trabajo ha sido desarrollado bajo los proyectos Fundación Séneca 19398/PI/14 y BFU-2013-45148-R.

#### 6. REFERENCIAS

- [1] McClung C.R. 2014. Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the *Arabidopsis* circadian clock. *F1000Prime Rep.* 6(2): 10-12703.
- [2] Bombarely A., Moser M., Amrad A., Bao M., Bapaume L., Barry C.S., ..., Bucher M. 2016. Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature Plants.* 2: 16074.
- [3] Box M.S., Coustham V., Dean C., Mylne J.S. 2011. Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from *Arabidopsis*. *Plant Methods.* 7(1): 7.
- [4] Thaben P.F., Westermark P.O. 2014. Detecting rhythms in time series with RAIN. *J. Biol. Rhythm.* 29 (6): 391-400.
- [5] McClung C.R. 2013. Beyond *Arabidopsis*: the circadian clock in non-model plant species. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 24(5): 430-436.
- [6] Fogelmark K., Troein C. 2014. Rethinking transcriptional activation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plos. Comput. Biol.* 10(7): e1003705.
- [7] Kim W.Y., Geng R., Somers, D.E. 2003. Circadian phase-specific degradation of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(8): 4933-4938.
- [8] Thain S.C., Murtas G., Lynn J.R., McGrath R.B., Millar A.J. 2002. The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant. Physiol.* 130(1): 102-110.



**Figura 1.** Árbol filogenético de los genes *PRRs* de arábidopsis (At) y petunia (PaxiN)



**Figura 2.** Abundancia de los transcritos de los genes reloj a lo largo del día, representados por distintos colores (ver leyenda). A) Arabidopsis (hoja), B) Petunia (pétalo), C) Petunia (hoja)

**Tabla 1.** Cebadores (5' → 3') de petunia (PaxiN)

Gen	Sentido	Antisentido
PaxiNFKF	CTGGGCAACCTCCAAAAGTT	CATGGATCAGAATCTTGTTTGCT
PaxiNGI1	TGGAGAAAGGGCAGAGACAT	GTGGAGCCACCCTTACGTT
PaxiNGI2	TTTAGAGTCCTTCACTCATCCATC	AATACAGCATTTGTTACATGGAGGT
PaxiNLHY	CGACGTGGTAGGAATTGCATC	GCAAGAAATGGTCATCAAAGGAC
PaxiNPRR3	GTGGAAGTGGTGATCGCTCT	TCCATCCTGACGCACAAAT
PaxiNPRR5a	CCAATGATGCCCATCTTCAT	ACGCTGCTCTGCAAGTTGTT
PaxiNPRR5b	GGAATCCCATCGATCTCAA	GGAGCCTCACTAGGTAATTGACC
PaxiNPRR7a	CAGAAGAGGAAGGAGCGATG	AGGAAAAGTAGGAAGGAAAGCA
PaxiNPRR7b	AGGTGCAAAATGCGGAAAGT	AGCATCTATCTTTCTTCTGTGACC
PaxiNPRR9	GAGCTCATGTTTCCGAGAGC	GGTCGCTGTTCTGCAAGTCT
PaxiNTOC1	TGATGGTAAGGGGAGCAAAG	CTGAAGCAGGATGCCATTA
PaxiNUBQ	TGGAGGATGGAAGGACTTTGG	CAGGACGACAACAAGCAACAG
PaxiNZTL	TGCATCTGTTGGCTCTGTTT	CCCCAACCAATCTCTTAGC