

Análisis genético comparativo de *Gigantea*, un gen implicado en el control del ritmo circadiano en Solanaceae

(Recibido: 25/04/2016; Aceptado: 20/06/2016)

Brandoli C.¹, Weiss J.², Egea-Cortines M.³

¹Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Edificio I+D+I Campus Muralla del Mar, s/n, 30203, Cartagena, Murcia, Spain;

^{2,3}ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain;

Teléfono: 600250391

Claudio Brandoli e-mail: claudio.brandoli@gmail.com

Resumen. La regulación de las funciones biológicas con periodicidad diaria es una característica de los eucariotas. Esta fluctuación depende del ritmo circadiano, un sistema endógeno que sincroniza los más importantes procesos metabólicos, fisiológicos y del comportamiento de la mayoría de los organismos, con la rotación de la Tierra. Uno de los genes implicados en esta importante regulación es *GIGANTEA* (*GI*), cuyas funciones moleculares aún no están claras. En este proyecto de tesis se pretende analizar los cambios fenotípicos y bioquímicos inducidos por el silenciamiento de genes y la mutación genética en Solanáceas con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la función de este gen y su posible regulación. Los principales métodos que se van a utilizar son la técnica de RNA de interferencia y el sistema de CRISPR/Cas9.

Palabras clave. *Petunia*, silenciamiento génico, CRISPR/Cas9 System, plásmido recombinante.

Abstract. Regulation of biological functions with daily frequency is a feature of eukaryotes. This fluctuation depends on the circadian rhythm, an endogenous system that synchronizes, the most important metabolic, physiologic and behavioral functions of most organism, with the rotation of Earth. One of the genes involved in this important regulation is *GIGANTEA* (*GI*), whose molecular functions are still not clear. In this thesis project will be analyzed phenotypic and biochemical changes induced by gene silencing and gene mutation in Solanaceae in order to deepen understanding of the function of this gene and its possible regulation. The main methods to be used, are respectively the interference-RNA technique and the CRISPR/Cas9 system.

Keywords. *Petunia*, gene silencing, CRISPR/Cas9 System, recombinant plasmid.

1. Introducción

El reloj circadiano endógeno es un cronómetro que controla muchos procesos rítmicos que tienen lugar durante las 24 horas en los organismos. En el reino vegetal, se ha descubierto que el movimiento de las hojas fue sólo uno entre muchos ritmos que participan en este ajuste, que incluye germinación, crecimiento, actividad enzimática, movimiento e intercambio de gases (History, Clock, Of, & Rhythms, 2006).

En los últimos años, algunos genes implicados en la regulación del ritmo circadiano se han identificado en *Arabidopsis thaliana*, un sistema modelo de planta utilizado frecuentemente para la identificación de genes y la determinación de sus funciones. Uno de estos es *Gigantea* (*GI*), un gen implicado en la regulación de la actividad fotosintética, apertura de las flores, emisión de aromas, acumulación de almidón, tolerancia a herbicidas, tolerancia al frío, tolerancia a la sequía, y el procesamiento de miRNA (Mishra & Panigrahi, 2015).

El proyecto de tesis que aquí se presenta tiene varios objetivos relacionados con la regulación genética de

GI en los cultivos de plantas con alelos de pérdida de función en *GI*. Para ello se van a utilizar la planta solanácea *Petunia hybrida*. El genoma de *Petunia* posee copias de *GI*, *PhGII* y *PhGI2*.

Para ello se van a llevar a cabo construcciones de silenciamiento por ARN de interferencia y un reciente método más innovador, llamado CRISPR/Cas9, con el fin de comparar y analizar el fenotipo silenciado con su respectiva línea silvestre. Se va a utilizar además, alelos de los genes *PhGII* y *PhGI2*, en las que se ha identificado inserciones del transposon *dTPH1*.

El Sistema CRISPR/Cas9 es un método para la edición de genomas, que permite hacer manipulaciones precisas de secuencias genómicas específicas. Este sistema se compone de una nucleasa llamada Cas9 y un RNA guía (sgRNA) específico que conduce la nucleasa en el sitio diana de DNA donde se hace un corte al doble filamento (DSBs). Esto produce la activación de dos diferentes vías de reparación: non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) (Zhang et al, 2016).

Algunas de las posibles aplicaciones son (1) mutagenesis simultánea de múltiples loci, (2) delección cromosómica específica, (3) eliminación

sinérgica o sincronizable de un gen de interés, (4) repression sinérgica o sincronizable de un gen de interés, (5) activación simultánea de múltiples genes y (6) repression simultánea de múltiples genes, como se ilustra en la Figura 3 (Lowder et al., 2015).

2. Materiales y métodos

2.1 Extracción, amplificación y análisis del ADN genómico

En todos los experimentos se han utilizados hojas y semillas de *Petuniahybrida*. El ADN se extrajo a partir de 100 mg de hojas jóvenes, utilizando el método estándar CTAB después haberlas homogenizadas con N₂ líquido. Se procedió con la purificación del material genético como indica (Sambrook et al, 1989) y con la amplificación de ADN por PCR. Las condiciones se modificaron dependiendo de los cebadores utilizados. Una vez amplificado el material genético se realizó un análisis electroforético, preparando geles de agarosa a diferentes porcentajes de concentración, dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN da analizar. El método utilizado es lo indicado por (Sambrook et al, 1989).

2.2 Identificación de inserciones de *dTPH1* en *PhGi1* y *PhGi2*.

Este trabajo no se ha terminado todavía. Se mencionará así, sólo algunos de los resultados obtenidos, teniendo en cuenta la posibilidad de citarlos en una futura publicación.

Para desarrollar este proyecto se seleccionó *Petunia hybrida* W138 que lleva en homocigosis la inserción de *dTPH1* en los genes *GII* y *GI2*.

Desde el Laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes de le Ecole Normale Supérieure de Lyon(ENSL)se enviaron las dos líneas con inserciones de transposones, *PhGi1::3087dTPH1* y *PhGi2::2995dTPH1*(Van den Broeck et al., 1998).

Las plantas híbridas F1 se obtuvieron mediante el cruce de W13 con Mitchell, una variedad que produce compuestos volátiles. Después de haber catalogado todas las plantas, se extrajo y amplificó el ADN de una hoja de cada muestra y se seleccionaron, por electrophoresis en gel de agarosa, las plantas que llevaban el transposón en forma heterocigótica. Como se puede ver en le figura 1, las cuatro plantas (#1,2,3,4) positivas para el *dTPH1* muestran una doble banda. Las mas anchas corresponden a el elemento transponible, amplificado de cebadores específicos, las otras, al ADN genómico no amplificado.

Las plantas heterocigotas se auto-polinizarán para obtener una segregación de tipo 1:2:1 en la generación F2, con el objetivo de seleccionar los individuos homocigotos para *dTPH1*.

2.3 Construcción del sistema de ARN de interferencia

Se empezó seleccionando una región del cDNA que codifica para *PhGI1* y *PhGI2* que discriminara entre los dos parálogos. Se amplificó un fragmento de DNA por PCR mediante el uso de cebadores sitio-específicos. Se insertó este fragmento en un vector genético llamado pDONR201 y luego se recombinó en pHELLSGATE12 usando el método Gateway technology de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 2).

Las plantas transgénicas se producirán con silenciamiento genético específico de *GII* y *GI2*.

2.4 Construcción de los vectores de ARN guía (sgRNA) por la edición de genoma segun el sistema de CRISPR/Cas9

Este trabajo se desarrollará durante los próximos meses. Hasta ahora se han obtenido cebadores que amplifican los genes GI 1 y 2 de *Petunia* de manera específica. Para hacer esto, se han diseñado dos gRNA, cada uno de la longitud de 20 pares de bases, de manera que contenían secuencias guía complementarias a diferentes hebras de ADN de *PhGi*. Cada secuencia se localizó también cerca una secuencia PAM (NGG) en la hebra complementaria del ADN diana.

3. Resultados y discusión

Nuestra intención es analizar los cambios fenotípicos y bioquímicos inducidos por silenciamiento y mutación genética a través de diferentes métodos para comprender mejor las funciones biológicas del gen GI y su implicación en la regulación del ritmo circadiano.

4. Figuras y Tablas

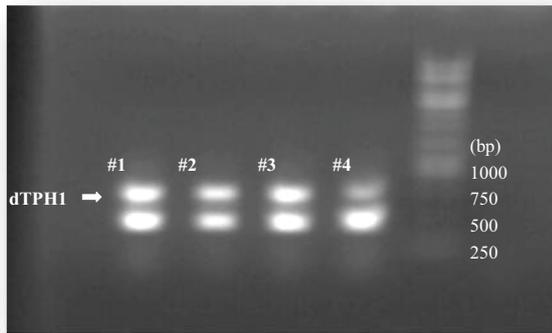


Fig 1: Identificación de dTPH1 en diferentes muestras de plantas, gel de agarosa al 1%.

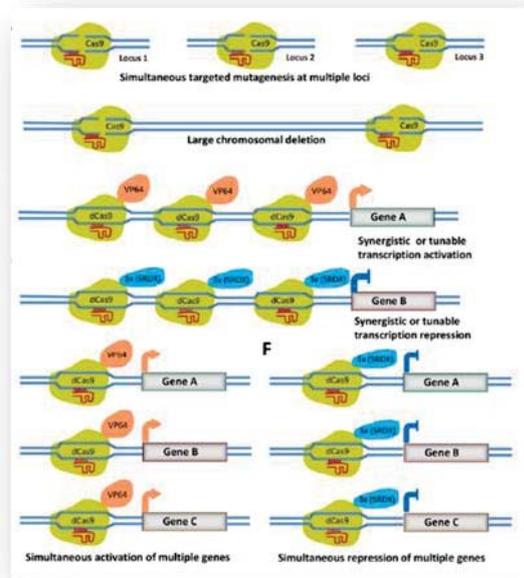


Fig 3: Aplicación de herramientas de CRISPR/Cas9, Lowder et al, 2015.

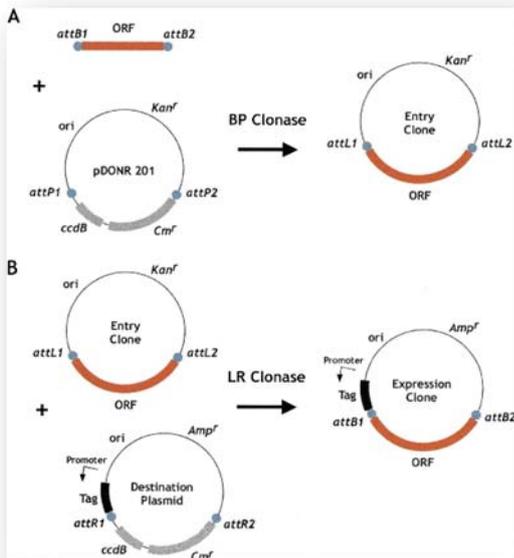


Fig 2: Sistema de recombinación sitio-específica Gateway de clonación (Marsischky & Lobaer, 2004).

Agradecimientos

Al Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), en especial manera a mi director y co-director de tesis, el Dr. Julia Rosl Weiss y el Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines por sus disponibilidad y valiosos consejos. También quiero agradecer a la Asociación de Jóvenes Investigadores de Cartagena que ofrece esta oportunidad de poder publicar en su anuario los trabajos hechos hasta ahora. Este trabajo hace parte del proyectos BFU-2013-45148-R y Seneca 19398 / PI / 14

Referencias

- [1] Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, 408(December).
- [2] History, T. H. E., Clock, O. F., Of, C., & Rhythms, C. (2006). *Plant Circadian Rhythms*, 18(April), 792–803.
- [3] Lowder, L. G., Zhang, D., Baltes, N. J., Iii, J. W. P., Tang, X., Zheng, X., ... L, N. C. L. G. (2015). A CRISPR / Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation 1 [OPEN], 169(October), 971–985. <http://doi.org/10.1104/pp.15.00636>
- [4] Marsischky, G., & Lobaer, J. (2004). Many Paths to Many Clones : A Comparative Look at High-Throughput Cloning Methods, 2020–2028.

- <http://doi.org/10.1101/gr.2528804.sequence> 13(1), 121–9. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00004.x
- [5] Mishra, P., & Panigrahi, K. C. (2015). GIGANTEA – an emerging story, 6(January), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00008>
- [6] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [7] Van den Broeck, D., Maes, T., Sauer, M., Zethof, J., De Keukeleire, P., D'hauw, M.,... Gerats, T. (1998). Transposon Display identifies individual transposable elements in high copy number lines. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*,
- [8] Zhang, B., Yang, X., Yang, C., Li, M., & Guo, Y. (2016). Exploiting the CRISPR / Cas9 System for Targeted Genome Mutagenesis in *Petunia*. *Nature Publishing Group*, (February), 1–8. <http://doi.org/10.1038/srep20315>