



Universidad
Politécnica
de Cartagena

“CONFIRMACIÓN DE *NANA* COMO
UN MUTANTE AFECTADO EN EL
RELOJ CIRCADIANO”

Pablo Antonio Galindo Galindo

Septiembre 2013



“CONFIRMACIÓN DE NANA COMO UN MUTANTE AFECTADO EN EL RELOJ CIRCADIANO”

PROYECTO FIN DE CARRERA
INGENIERÍA AGRONÓMICA

Directores del proyecto:

Dr. Julia Rosl Weiss (JW)

Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines (MEC)

Pablo Antonio Galindo Galindo (PAG)

Septiembre 2013

PROYECTO FIN DE CARRERA

Ref. ETSIA_IA_BIOL_MOL0012-13_PFC001.doc

TD	FECHA	DESCRIPCIÓN	ADM	REV	APR
P1	Jun-13	Introducción	PAG	JW MEC	JW MEC
P2	Jul-13	El reloj circadiano	PAG	JW MEC	JW MEC
P3	Jul-13	Objetivos del proyecto	PAG	JW MEC	JW MEC
P4	Ago-13	Materiales y métodos	PAG	JW MEC	JW MEC
P5	Sept-13	Resultados	PAG	JW MEC	JW MEC
P6	Sept-13	Discusión	PAG	JW MEC	JW MEC
P7	Sept-13	Conclusiones	PAG	JW MEC	JW MEC

Ilustración de la portada. Primera imagen de difracción de rayos X del DNA. Rosalind Franklin es recordada principalmente por la llamada Fotografía 51, la imagen del ADN obtenida mediante difracción de rayos X, que sirvió como fundamento para la hipótesis de la estructura doble helicoidal del DNA en la publicación del artículo de James Watson y Francis Crick de 1953, y tras su publicación constituyó una prueba crítica para la hipótesis.

Agradecimientos

A Mavi, por su tiempo, paciencia, comprensión, y por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría.

Quiero agradecer a Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines y a la Dr. Julia Rosl Weiss sus inestimables consejos y el continuo estímulo para llevar a buen término este proyecto fin de carrera.

Extender los agradecimientos al Instituto de Biotecnología Vegetal por dejarnos usar sus instalaciones y equipos.

Este proyecto fin de carrera ha sido posible gracias al proyecto MCINN. BFU2010-15843 de “Análisis genético de rutas biológicas y señales ambientales involucradas en el control de tamaño floral y caracteres de inflorescencia”.

Y, finalmente, a mi familia, a mis compañeros del área de Genética Molecular y a mis amigos, por su ánimo y apoyo desinteresados.

Índice

I.	Listado de tablas.....	8
II.	Listado de figuras.....	10
1.	INTRODUCCIÓN	17
1.1.	Modificación genética, hacia el desarrollo de variedades de plantas ornamentales transgénicas.....	19
1.1.1.	Valor económico.....	21
1.1.2.	Líneas de investigación	21
1.1.2.1.	Transformación.....	21
1.1.2.2.	Modificación del color floral.....	22
1.1.2.3.	Modificación de la fragancia.....	25
1.1.2.4.	Resistencia al estrés abiótico	25
1.1.2.5.	Resistencia a enfermedades	25
1.2.	<i>Antirrhinum majus</i> , una planta modelo	26
1.2.1.	Cuando la genética molecular decide entrar en la floración	27
1.2.2.	Lectura del control que ejercen las proteínas.....	29
1.2.3.	Un mapa de recombinación molecular para <i>Antirrhinum majus</i>	30
1.2.4.	El grupo <i>Antirrhinum</i>	33
1.3.	<i>nana^{nana}</i> , descubriendo al mutante.....	36
1.3.1.	Estudios llevados a cabo en el laboratorio	37
1.3.1.1.	Estudio de los parámetros vegetativos.....	38
1.3.1.2.	Estudio de los parámetros florales	38
1.3.1.3.	Estudio de rescate de altura mediante aplicación de GAs.....	40
1.3.1.4.	Estudio sobre el efecto del paclobutrazol en la tasa de germinación de semillas.....	43
1.3.1.5.	Análisis transcriptómico de <i>nana</i> indica posible función sobre el reloj circadiano ..	44
2.	EL RELOJ CIRCADIANO	47
2.1.	Características del reloj circadiano.....	47
2.2.	El paradigma actual del reloj: bucles entrelazados retroalimentados	49
2.2.1.	El paradigma actual aplicado a plantas: el modelo del oscilador	49
2.3.	Señalización ambiental y ritmo circadiano	53
2.3.1.	Luz	53
2.3.2.	Temperatura	54
2.4.	Floración y ritmo circadiano.....	55

3. OBJETIVO DEL PROYECTO	58
3.1. El mutante <i>nana</i> como paradigma de producto agrícola exitoso.....	58
3.2. El reloj circadiano de <i>Antirrhinum majus</i>	59
3.3. <i>Antirrhinum majus nana</i> y el reloj circadiano	59
4. MATERIALES Y MÉTODOS	60
4.1. Material vegetal	60
4.1.1. Descripción taxonómica.....	60
4.1.2. Descripción botánica.....	62
4.2. Condiciones de crecimiento	64
4.3. Sistema de muestreo circadiano en cámaras de cultivo.....	70
4.3.1. Toma de muestras	71
4.4. Extracciones de DNA	71
4.5. Extracciones de RNA	72
4.6. Síntesis de cDNA	72
4.7. PCR a tiempo final	73
4.8. PCR cuantitativa	74
4.9. Análisis de estructura y filogenia.....	75
4.9.1. Realización de árboles filogenéticos	75
4.10. Normalizado de datos de Q-PCR	76
4.11. Análisis de datos de ritmo circadiano	76
4.12. Desarrollo de cebadores para Q-PCR.....	77
4.12.1. Cebadores del gen <i>TIMING OF CAB 1 (TOC1)</i>	79
4.12.2. Cebadores del gen <i>CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)</i>	80
4.12.3. Cebadores del gen <i>CONSTANS (CO)</i>	82
4.12.4. Cebadores del gen <i>UBIQUITIN PROTEIN LIGASE (UBI)</i>	83
4.13. Optimizado y mejora del procedimiento de extracción de RNA.....	84
4.13.1. Tratamiento DNasa	87
4.13.2. Primera hebra de cDNA	87
4.13.3. Fin de la contaminación	88
4.13.4. Digestión, precipitación y purificación de RNA.....	89
4.13.4.1. Reactivos.....	89
4.13.4.2. Protocolo de digestión, precipitación y purificación de RNA.....	90

5. RESULTADOS	91
5.1. Estudio del gen de referencia <i>UBIQUITIN PROTEIN LIGASE (UBI)</i>	91
5.2. Estudio del gen <i>TIMING OF CAB 1 (TOC1)</i>.....	92
5.2.1. Estructura y filogenia del gen <i>AmTOC1</i>	92
5.2.2. Control de <i>AmTOC1</i> en el reloj circadiano	95
5.2.2.1. <i>AmTOC1</i> , genotipo silvestre	96
5.2.2.2. <i>AmTOC1</i> , genotipo mutante	98
5.3. Estudio del gen marcador <i>CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)</i>.....	100
5.3.1. Estructura y filogenia del gen <i>AmCAB</i>	100
5.3.2. Control de <i>AmCAB</i> por el reloj circadiano.....	104
5.3.2.1. <i>AmCAB</i> , genotipo silvestre.....	104
5.3.2.2. <i>AmCAB</i> , genotipo mutante	106
5.4. Estudio del gen <i>CONSTANS (CO)</i>	108
5.4.1. Estructura y filogenia del gen <i>AmCO</i>	108
5.4.2. Control de <i>AmCO</i> por el reloj circadiano	111
5.4.2.1. <i>AmCO</i> , genotipo silvestre	112
5.4.2.2. <i>AmCO</i> , genotipo mutante.....	114
6. DISCUSIÓN	116
6.1. <i>TIMING OF CAB 1</i>, la arritmia de un gen fundamental	116
6.2. <i>CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN</i>, un gen controlado por el reloj	117
6.3. <i>CONSTANS</i>, el último paso hacia la floración.....	119
7. CONCLUSIONES	120
8. BIBLIOGRAFÍA.....	121

I. Listado de tablas

Tabla 1. Grupos y géneros mayoritarios de plantas ornamentales (Chandler & Sanchez, 2012).....	20
Tabla 2. Ejemplos recientes de modificación del color floral usando modificación genética (Chandler & Sanchez, 2012).....	23
Tabla 3. Mediciones de diferentes parámetros vegetativos del mutante <i>nana</i> frente a silvestre (165E). Las diferentes letras indican diferencias aplicando el test de múltiple rango de Duncan ($p < 0.05\%$). Los datos se obtuvieron cuando se observó la aparición del primer meristemo floral.	38
Tabla 4. Parámetros sobre el tamaño floral en <i>nana</i> vs silvestre (165E). Las diferentes letras indican diferencias aplicando el test de múltiple rango de Duncan ($p < 0.05\%$).	40
Tabla 5. Efecto de la aplicación de GA en los parámetros vegetales del silvestre frente al mutante <i>nana</i> . Las diferentes letras indican diferencias aplicando el test de múltiple rango de Duncan ($p < 0.05\%$). La medida de la longitud de los entrenudos se corresponde con la de los siete primeros.	42
Tabla 6. Expresión relativa de los homólogos GA2 oxidasa y GA20 oxidasa de <i>A. majus nana</i> frente al silvestre. Los datos se normalizaron frente a ubiquitina. Se determinó que se estaba sobreexpresado o bajoexpresado con un valor p de 0.05 siendo los valores en color azul significativamente diferentes.	43
Tabla 7. Efecto del paclobutrazol en la tasa de germinación de semillas en silvestre frente a <i>nana</i>	44
Tabla 8. Parte del análisis transcriptómico del mutante <i>nana</i> frente a la línea parental Sippe 50. Up significa que ese gen se encuentra sobreexpresado en el mutante frente a Sippe 50 y down significa que se encuentra reprimido con respecto a Sippe 50.	46
Tabla 9. Genes conocidos en <i>Arabidopsis</i> con funciones circadianas (C.R. McClung, 2006).	52
Tabla 10. Datos climáticos obtenidos semanalmente durante el período de crecimiento de las plantas necesarios para el cálculo de las necesidades hídricas del cultivo. Estos datos fueron obtenidos de la estación agrometeorológica del SIAM en La Palma, Cartagena.	65

Tabla 11. Evapotranspiración de referencia (ET_0) y evapotranspiración del cultivo calculada semanalmente para el ciclo de cultivo (ET_c).....	66
Tabla 12. Dosis de riego aplicada a cada maceta con un intervalo de 3 días con los volúmenes especificados para cada semana.	69
Tabla 13. Cebadores utilizados en nuestros experimentos. La nomenclatura seguida es la siguiente: primero las siglas del material vegetal (<i>Am</i> , <i>Antirrhinum majus</i>) seguido del gen para el cual está diseñado el cebador y finalmente si se trata del cebador directo (-for, forward) o del cebador inverso (-rev, reverse).....	78

II. Listado de figuras

- Figura 1. Modificación del color en *Dianthus caryophyllus* (clavel). Las flores mostradas se corresponden con una planta control (derecha) y de una planta transgénica (izquierda) expresando el gen flavonoide 3'5'-hidroxilasa de una *Viola tricolor* (pensamiento), (Chandler & Sanchez, 2012).....22
- Figura 2. Color floral modificado genéticamente en *D. caryophyllus* (clavel) y *R. x hybrida* (rosa) en Sudamérica. Las placas petri muestran la selección anual por GM en clavel (1), plantación comercial de clavel GM (2,4) y rosa (3), procesado post-cosecha de diferentes variedades de clavel GM (5) y control de la calidad post-cosecha en clavel GM (6) (Chandler & Sanchez, 2012).....24
- Figura 3. Diferentes plantas de *Antirrhinum majus* (Grupo de Genética de la UCM).....26
- Figura 4. Prof. Dr. Erwin Baur, director fundador del Instituto Kaiser Wilhelm (Instituto Max Planck para la Investigación en Mejora de Plantas).27
- Figura 5. Diagrama de la estructura floral organizada en cuatro verticilos (whorls) (Schwarz-Sommer et al., 2003).....30
- Figura 6. Mapa molecular de ligamiento de *Antirrhinum majus* Sippe 50 x 165E. Los ocho grupos de ligamiento están orientados, numerados y nombrados tal y como se hiciera en mapas de *Antirrhinum* previos. Las posiciones se han dado en centiMorgans (Kosambi). Los *loci* de codificación de proteínas se han nombrado con el número de accesión de EMBL y con el nombre de su gen en letras cursivas (Schwarz-Sommer et al., 2010).32
- Figura 7. Subsecciones del grupo *Antirrhinum* (Feng et al., 2009).33
- Figura 8. Comparación entre *A. charidemi* (izq.) y *A. majus* (derecha). (A) Flores individuales en vista lateral. (B) Hojas del nodo 4. (C) Plantas completas. Las barras de escala son de 1 cm para las ilustraciones A y B y de 10 cm para C (Langlade et al., 2005). 34
- Figura 9. Correlaciones entre áreas de pétalos y hojas. (A) medio del área del pétalo frente al tamaño medio del área de la hoja para cada una de las especies ($r = 0.65$ para los individuales). Los miembros de la subsección *Antirrhinum* están mostrados en rojo, los de la subsección *Kickxiella* en azul, mientras que los miembros de la subsección *Streptosepalum* se encuentran en negro. aus = *A. australe*, bar = *A. braun-blanquetii*, boi = *A.*

boisieri, *chi* = *A. charidemi*, *cir* = *A. cirrhigerum*, *gra* = *A. graniticum*, *his* = *A. hispanicum*, *lat* = *A. latifolium*, *lin* = *A. linkianum*, *lit* = *A. litigiosum*, *lop* = *A. lopesianum*, *maj* = *A. majus*, *meo* = *A. meonanthum*, *mic* = *A. microphyllum*, *mol* = *A. molle*, *mos* = *A. mollissimum*, *per* = *A. pertegasii*, *psu* = *A. pseudomajus*, *pul* = *A. pulverulentum*, *sem* = *A. sempervirens*, *sic* = *A. siculum*, *str* = *A. striatum*, *tor* = *A. tortuosum*, *val* = *A. valentinum*. (B) área media de los pétalos frente al área media de las hojas de la población F2. La línea de regresión del eje mayor se encuentra en rojo, $r = 0.55$ (Feng et al., 2009).....35

Figura 10. Notas originales del Dr. Stubbe en alemán tal y como se guardaron en Gatersleben (Stubbe, 1974).....37

Figura 11. Plantas de *Antirrhinum majus* objeto de estudio. A la derecha, uno de los mutantes seleccionados e izquierda, planta de *Antirrhinum majus nana*.39

Figura 12. Características de las mediciones.40

Figura 13. Efecto de la aplicación de GAs en silvestre frente a *nana*.....41

Figura 14. Nomenclatura usada para describir los ritmos circadianos (C.R. McClung, 2006).....48

Figura 15. Modelo molecular del Oscilador Circadiano de *Arabidopsis thaliana*. Los genes están indicados mediante cajas sólidas con los nombres indicados a la izquierda. Las proteínas están indicadas mediante formas ovaladas y oblongas, con el nombre de la proteína indicado en el interior de las formas. La transcripción y traducción están señaladas mediante líneas discontinuas. La actividad de las proteínas está descrita mediante líneas solidas, con líneas que terminan en punta de flecha y líneas acabando en discontinuas perpendiculares indican acción positiva y negativa respectivamente. El bucle principal retroalimentado CCA1/LHY/TOC1 está subrayado en verde con líneas marcadas y formas cerradas. La fosforilación de LHY y CCA1 por CK2 está indicada mediante fósforos circulados P. El área sombreada marca las actividades que alcanzan un máximo durante la subjetiva noche, y el área de color blanco indica las actividades que alcanzan ese máximo durante el subjetivo día (C.R. McClung, 2006).....51

Figura 16. Fenotipos de *Antirrhinum majus*. En la imagen de la izquierda, de izquierda a derecha: cuatro *Antirrhinum majus* de una de las líneas silvestres y cuatro mutantes *nana*. En la imagen de la derecha, de izquierda a derecha: cuatro *Antirrhinum majus* de una de las líneas silvestres y cuatro mutantes *nana* nuevamente.58

Figura 17. Invernaderos del laboratorio. Estación Experimental Tomás Ferro.....	60
Figura 18. Primera descripción publicada de <i>Antirrhinum majus</i> (Linneo, 1753).....	61
Figura 19. Descripción botánica de <i>Antirrhinum majus</i> (Thomé, 1885).....	63
Figura 20. Coeficiente de cultivo (K_c) inicial y medio obtenidos en función de la ETo y la profundidad de infiltración.	67
Figura 21. Coeficiente de localización (K_L) a partir del porcentaje de cobertura media a partir de la media de los resultados de las fórmulas propuestas por los autores Aljibury et al., Decroix, Hoare et al., Keller y Sharples et al.....	68
Figura 22. Programación diaria de las cámaras de cultivo durante el transcurso del establecimiento y acondicionamiento de las plantas. La radiación media durante el periodo diurno fue de 30 W/m ²	70
Figura 23. Sincronización de las cámaras de cultivo. El color de fondo gris indica el periodo nocturno y el color amarillo el diurno. C1 se corresponde con la cámara de cultivo 1 y C2 con la cámara de cultivo 2. La hora real hace referencia a la hora del día en que se tomaron las muestras (elaboración propia).....	71
Figura 24. ClustalX de <i>AmTOC1</i> frente a sus cebadores <i>AmTOC1-for</i> y <i>AMTOC1-rev</i>	79
Figura 25. De izquierda a derecha: Ladder; <i>AmTOC1</i> ; 1 gDNA Sippe50, 2 gDNana, 3 gDNanana, 4 gDNA 165E, 5 H ₂ O. Para cada una de las muestras: el primer número indica el orden en que se encuentra justo después del Ladder, el segundo número indica la hora del día circadiano de la muestra y por último la especificación de qué tipo de producto hablamos pudiendo ser cDNA, DNA genómico (gDNA) o RNA.	80
Figura 26. ClustalX de <i>AmCAB</i> frente a sus cebadores <i>AmCAB-for</i> y <i>AmCAB-rev</i>	81
Figura 27. De izquierda a derecha: Ladder; <i>AmCAB</i> ; 1 0900 cDNAwt, 2 0900 cDNana, 3 1300 cDNAwt, 4 1300 cDNana, 5 1700 cDNAwt, 6 1700 cDNana, 7 2100 cDNAwt, 8 2100 cDNana, 9 0100 cDNAwt, 10 0100 cDNana, 11 0500 cDNAwt, 12 0500 cDNana, 13 H ₂ O, 14 gDNAwt, 15 gDNana, 16 RNA.	82
Figura 28. De izquierda a derecha: Ladder; <i>AmCDF</i> (<i>CICLING DOF FACTOR</i>); <i>AmCO</i> ; 1 gDNA Sippe50, 2 gDNana, 3 gDNanana, 4 gDNA 165E, 5 H ₂ O.	82

Figura 29. ClustalX de *AmCO* frente a sus cebadores *AmCO-for* y *AmCO-rev*.....83

Figura 30. ClustalX de *AmUBI* frente a sus cebadores *AmUBI-for* y *AmUBI-rev*84

Figura 31. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900wt, 2 0900na, 3 1300wt, 4 1300na, 5 1700wt, 6 1700na, 7 2100wt, 8 2100na, 9 0100wt, 10 0100na, 11 0500wt, 12 0500na, 14 H₂O, 16 gDNAwt (silvestre), 18 gDNana.....85

Figura 32. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900wt, 2 0900na, 3 1300wt, 4 1300na, 5 1700wt, 6 1700na, 7 2100wt, 8 2100na, 9 0100wt, 10 0100na, 11 0500wt, 12 0500na, 13 H₂O, 14 2100 gDNAwt, 15 0500 gDNana, 16 0900 RNAwt, 17 0900 RNana.....86

Figura 33. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900 RNAwt, 2 0900 RNana, 3 1300 RNAwt, 4 1300 RNana, 5 1700 RNAwt, 6 1700 RNana, 7 2100 RNAwt, 8 2100 RNana, 9 0100 RNAwt, 10 0100 RNana, 11 0500 RNAwt, 12 0500 RNana, 14 H₂O, 16 gDNAwt, 18 gDNana.....86

Figura 34. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900 RNAwt, 2 0900 RNana, 3 1300 RNAwt, 4 1300 RNana, 5 1700 RNAwt, 6 1700 RNana, 7 2100 RNAwt, 8 2100 RNana, 9 0100 RNAwt, 10 0100 RNana, 11 0500 RNAwt, 12 0500 RNana, 13 H₂O, 14 gDNA.....87

Figura 35. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900 cDNAwt, 2 0900 cDNana, 3 1300 cDNAwt, 4 1300 cDNana, 5 1700 cDNAwt, 6 1700 cDNana, 7 2100 cDNAwt, 8 2100 cDNana, 9 0100 cDNAwt, 10 0100 cDNana, 11 0500 cDNAwt, 12 0500 cDNana, 13 gDNAwt, 14 gDNana, 15 H₂O.88

Figura 36. De derecha a izquierda: Ladder; *AmTOC1*; 1 0900 cDNAwt, 2 0900 cDNana, 3 1300 cDNAwt, 4 1300 cDNana, 5 1700 cDNAwt, 6 1700 cDNana, 7 2100 cDNAwt, 8 2100 cDNana, 9 0100 cDNAwt, 10 0100 cDNana, 11 0500 cDNAwt, 12 0500 cDNana, 13 H₂O, 14 gDNAwt, 15 gDNana, 16 RNA.89

Figura 37. ClustalX de TIMING OF CAB1. *Am*, *Antirrhinum majus* y; *At*, *Arabidopsis thaliana*. PRR3, PRR5, PRR7 y PRR9 forman, junto con TOC1, el grupo multigénico *PRR* en el genoma de *Arabidopsis*.93

Figura 38. ClustalX de diversas ortólogas a TIMING OF CAB1. *Pt*, *Populus trichocarpa*; *Vv*, *Vitis vinífera*; *Fv*, *Fragaria vesca*; *Na*, *Nicotiana attenuata*; *Mc*, *Mesembryanthemum crystallinum* y; *Am*, *Antirrhinum majus*.....94

Figura 39. Árbol filogenético del gen *TIMING OF CAB 1*. El árbol filogenético se ha llevado a cabo con CLC Sequence Viewer® utilizando el método Neighbor-joining. En los nodos aparecen los valores de Bootstrap (valores calculados a partir de 1.000 repeticiones).95

Figura 40. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *TIMING OF CAB 1 (TOC1)* para el genotipo silvestre *Antirrhinum majus Nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja).....97

Figura 41. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *TIMING OF CAB 1 (TOC1)* para el genotipo mutante *Antirrhinum majus nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja).....99

Figura 42. ClustalX de varias proteínas CAB. Am, *Antirrhinum majus y*; At, *Arabidopsis thaliana*. 101

Figura 43. ClustalX de varias proteínas producto de CAB de varias especies. Vr, *Vigna radiata*; Gm, *Glycine max*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Fv, *Fragaria vesca*; Am, *Antirrhinum majus*. 102

Figura 44. Árbol filogenético del gen *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN*. El árbol filogenético se ha llevado a cabo con CLC Sequence Viewer® utilizando el método Neighbor-joining. En los nodos aparecen los valores de Bootstrap (valores calculados a partir de 1.000 repeticiones)..... 103

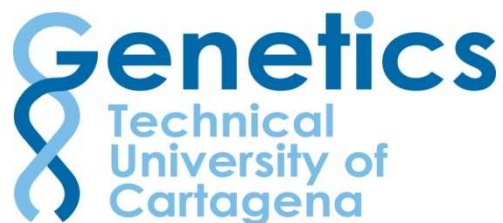
Figura 45. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)* para el genotipo silvestre *Antirrhinum majus Nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos (réplicas biológicas en lo sucesivo) con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja)..... 105

- Figura 46. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)* para el genotipo mutante *Antirrhinum majus nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja). 107
- Figura 47. ClustalX de CONSTANS. Am, *Antirrhinum majus* y; At, *Arabidopsis thaliana*. BBX, proteínas B-BOX denominadas también como COL; COL, CONSTANS-LIKE denominadas también como proteínas B-BOX..... 109
- Figura 48. ClustalX de CONSTANS. Tc, *Theobroma cacao*; Rc, *Ricinus communis*; Md, *Malus domestica*; Am, *Antirrhinum majus*. BBX, B-BOX..... 110
- Figura 49. Árbol filogenético del gen *CONSTANS*. El árbol filogenético se ha llevado a cabo con CLC Sequence Viewer® utilizando el método Neighbor-joining. En los nodos aparecen los valores de Bootstrap (valores calculados a partir de 1.000 repeticiones). 111
- Figura 50. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *CONSTANS (CO)* para el genotipo silvestre *Antirrhinum majus Nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja). 112
- Figura 51. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *CONSTANS (CO)* para el genotipo mutante *Antirrhinum majus nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja). 114



“CONFIRMACIÓN DE NANA COMO UN MUTANTE AFECTADO EN EL RELOJ CIRCADIANO”

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
ÁREA DE GENÉTICA MOLECULAR



Pablo Antonio Galindo Galindo

Septiembre 2013

1. Introducción

La columna vertebral de la biología ha sido y sigue siendo la evolución. Es bien sabido que Darwin fue el fundador de la teoría moderna de la evolución.

Hoy en día, casi sin excepciones, estamos convencidos por una vasta cantidad de evidencia acumulada de que la Tierra tiene una larga historia y de que todos los organismos vivos, incluidos nosotros mismos, aparecieron en el curso de esa historia a partir de formas anteriores más primitivas. Esta evidencia acumulada está formada por una trama tejida con miles y miles de datos concernientes a los organismos del pasado y del presente, que abarca no solo la estructura anatómica, sino también procesos fisiológicos y bioquímicos, patrones del desarrollo embrionario y de comportamiento y, más reciente, las secuencias de información genética codificadas en las moléculas del DNA de los cromosomas.

Si hay algo que todos los seres vivos comparten es una historia evolutiva ya que son sistemas abiertos que almacenan y procesan información. Esto se debe a que los seres vivos intercambian sustancias y energía con el medio externo. Las sustancias que se incorporan a un organismo ingresan a una red de reacciones químicas en las que esas sustancias se degradan o se utilizan para la construcción de compuestos más complejos. Los organismos vivos son también expertos en la conversión energética. La energía que ingresa, ya sea en forma de luz solar o de energía química almacenada en los alimentos, es transformada y usada por cada célula individual para hacer el trabajo celular. Este trabajo incluye el dar energía no sólo para los numerosos procesos que constituyen las actividades del organismo, sino también para la síntesis de moléculas y estructuras celulares.

Por todas estas razones podemos afirmar que la vida es un proceso rítmico en la que los seres vivos tienen que hacer frente a variaciones regulares de la información que posteriormente almacenan y procesan. De este hecho surge la cronobiología, una disciplina de la fisiología que estudia los ritmos biológicos, entendidos como una oscilación de un parámetro biológico dependiente de un reloj endógeno y de

sincronizadores ambientales. Al investigar las causas de estos “relojes” se demuestra que gran parte de ellas tienen un origen externo, como pueden ser los cambios climáticos estacionales tales como la fotoperiodicidad o la termoperiodicidad, cambios en el ciclo lunar, mareas, etc. De acuerdo con la duración de estos ritmos extrínsecos se distinguen los ritmos nictemerales o circadianos, cuando el periodo es de aproximadamente 24 horas, los mensuales y los anuales.

La ciencia de la Genética empezó con el trabajo del monje austríaco Gregor Mendel, quien en 1865 publicó el resultado de sus experimentos de cruces entre variedades del guisante cultivado que tenían variantes heredables. Mendel no solo suministró los resultados experimentales de cruces controlados, sino que también infirió la existencia de “factores” discretos que contenían la información sobre el desarrollo de padres a hijos. Cualquiera que sea la base física de este sistema de transmisión de información debe tener las siguientes cuatro propiedades:

1. *Diversidad de estructura.* Las estructuras celulares que contienen la información sobre el desarrollo y la función deben poder existir en un número de formas distintas.
2. *Capacidad de replicación.* Debe haber algún mecanismo de replicación que copie la estructura que contiene la información para que ésta pueda ser transmitida de padres a hijos.
3. *Mutabilidad.* Todas las especies que existen han surgido de la evolución de especies ancestrales que diferían de ellas en varios caracteres. Así, en algún momento del pasado, debieron de surgir mutaciones que alteraron parte de la información transmitida entre padres e hijos, y estos cambios se debieron heredar. La acumulación de un número de mutaciones puede incluso originar la formación de estructuras totalmente nuevas.
4. *Traducción.* No basta con la existencia de un mecanismo que transfiera la información de un organismo de generación en generación sino que es necesaria una maquinaria que pueda leer la información heredada y traducirla a la gran diversidad de estructuras biológicas que constituyen la forma y la función del organismo.

La clave del análisis genético de una propiedad biológica consiste en examinar los componentes de la misma así como el sistema de control. Para ello se utiliza en muchos

vasos variaciones en los genes que permiten inferir en su participación con causa y/o efecto de un proceso.

1.1. Modificación genética, hacia el desarrollo de variedades de plantas ornamentales transgénicas

Las plantas ornamentales juegan un papel fundamental en la interacción entre humanos y modificando el medio que nos rodea. Se ha conseguido reunir y domesticar durante miles de años plantas que no tienen valor alimentario únicamente por su valor ornamental o la morfología de sus flores (C.R. Hall & Dickson, 2011). Debido a las continuas exploraciones se recogieron numerosas variedades ornamentales alrededor del mundo se pudo explotar la variación que se generaba a través de cruzamientos y mutaciones, de esta forma, el rango y la diversidad de plantas ornamentales cultivadas creció exponencialmente. Ahora, miles de variedades de flor cortada, plantas en maceta, plantas colgantes, procedentes de semillero, arbustos, gran cantidad de céspedes, árboles ornamentales y plantas acuáticas están disponibles al público (Dobres, 2011).

Flor cortada	Céspedes ornamentales	Palmeras	Maceta e interior	Plantas de semillero	Arbustos	Árboles	Miscelánea
Rosa	<i>Festuca</i> spp.	Palmito	<i>Phalaenopsis</i> spp	Petunia	Rosa	Cornejo	Bonsai
Clavel	Césped verde	Palmera datilera	Rosa	Pensamiento	Hortensia Rododendro Azalea spp.	<i>Cotoneaster</i> spp.	Cactus
Crisantemo	<i>Deschampsia</i> spp.	Palmera datilera de Canarias	<i>Kalanchoe</i> spp.	<i>Impatiens</i> spp.	<i>Abelia</i> spp.	Arce	Carnosas
Tulipán	<i>Panicum</i> spp.	Palmito sabal	<i>Campanula</i> spp.	Begonia	<i>Viburnum</i> spp.	Sauce	Aéreas
Lirio	<i>Agrostis</i> spp.	Palmito sago	Hiedra inglesa	Torenia	Lirio africano	Abedul	Helecho
Gerbera	<i>Miscanthus sinensis</i>	Butiá	<i>Anthurium</i> spp.	<i>Salvia</i> spp.	<i>Camellia</i> spp.	Ceniza	Plantas con formas
<i>Gypsophila</i> spp. Lirio peruano <i>Freesia</i> spp.	<i>Carex</i> spp.	Palmera pindó	<i>Dracaena</i> spp. Chrysanthemum <i>Ficus</i> spp.	<i>Calibrachoa</i> spp. Lobelia <i>Osteospermum</i> spp.	<i>Fuchsia</i> spp. <i>Grevillia</i> spp. Lavanda	Eucalipto <i>Liquidambar</i> spp. Cedro	
<i>Cymbidium</i> spp.			<i>Spathiphyllum</i> spp.	Verbena	<i>Ficus</i> spp.	Morera	
<i>Anthurium</i> spp. <i>Eustoma</i> spp. <i>Zantedeschia</i> spp. <i>Dendrobium</i> spp. <i>Phalaenopsis</i> spp. <i>Narcissus</i> spp. Hortensia			<i>Cyclamen</i> spp. Lirio Geranio Poinsetia Brezo Malamadre Bromelia Cactus Bonsai	Pink plant Violate africana Azafrán <i>Narcissus</i> spp. <i>Skimmia</i> spp. Eléboro	<i>Magnolia</i> spp. <i>Lagerstroemia</i> spp. Alheña Hiedra Hibisco Brezo <i>Skimmia</i> spp. <i>Gaultheria</i> spp.	Álamo <i>Prunus</i> spp. Roble Olmo <i>Chamaecyparis</i> spp. Paulonia	

Tabla 1. Grupos y géneros mayoritarios de plantas ornamentales (Chandler & Sanchez, 2012).

1.1.1. Valor económico

Aunque las estadísticas son difusas y subjetivas, de acuerdo con las estimaciones de UN COMTRADE (Naciones Unidas, <http://www.un.org/>) para 2010, únicamente el comercio de plantas de flor fue de 8 mil millones de USD.

Estudios de la US National Gardening Association (National Gardening Association, <http://www.gardenresearch.com/>) estiman que los consumidores norteamericanos destinan un total de 40 mil millones de USD por año en el cuidado profesional de céspedes, mantenimiento de jardines, paisajismo, y servicios especializados en cuidados de árboles. Se ha estimado en 175 mil millones de USD las ventas totales en EE.UU. para todos los aspectos relacionados con la horticultura, representando esta cifra el 0.76% del producto doméstico en este país (Charles R Hall, Hodges, & Haydu, 2006).

1.1.2. Líneas de investigación

La modificación genética, GM en adelante, de plantas se ha desarrollado en mayor parte para obtener variedades resistentes a insectos y a herbicidas como maíz (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), colza (*Brassica napus*), algodón (*Gossypium spp.*), etc. En algunas ornamentales, el desarrollo de nuevas variedades usando como técnicas la hibridación o la mutagénesis pueden resultar muy dificultosas y bastante prolongadas en el tiempo e, incluso, existe la posibilidad de que no sea una opción si las variedades son completamente estériles, como ocurre en orquídeas (Teixeira da Silva, Chin, Van, & Mii, 2011). Para estos casos la GM nos permite una vía para la mejora de variedades. En otras ornamentales existen variedades con cualidades post-cosecha, resistencia a enfermedades y productividad excelentes. Así, usando técnicas de GM podemos retener esas cualidades en las líneas transgénicas mientras que podemos ir incrementando la característica principal (el color de las flores, por ejemplo).

1.1.2.1. Transformación

Se ha conseguido que alrededor de 50 variedades de plantas ornamentales puedan ser transformadas (Brand, 2006; Shibata, 2008). Los retos asociados con la consecución de poder transformar ornamentales son los mismos que ya conocemos para las demás especies de plantas. De este modo, podemos incluir la resistencia a la infección por *Agrobacterium* en especies monocotiledóneas, variabilidad en la regeneración al transformar variedades lejanas, eficiencia de la transformación, variación somaclonal y las dificultades asociadas con la regeneración de tejidos maduros de plantas en leñosas.

Trabajos recientes desarrollados en el laboratorio han permitido obtener un protocolo de transformación muy reproducible para *Antirrhinum majus* (Manchado-Rojo, Delgado-Benarroch, Roca, Weiss, & Egea-Cortines, 2012).

1.1.2.2. *Modificación del color floral*

Los únicos productos obtenidos por GM que se han establecido bien en el mercado son el clavel (*Dianthus caryophyllus*) y la rosa (*Rosa x hybrida*). Se ha adoptado la nomenclatura “*hybrida*” para híbridos cuyo origen botánico sea incierto.



Figura 1. Modificación del color en *Dianthus caryophyllus* (clavel). Las flores mostradas se corresponden con una planta control (derecha) y de una planta transgénica (izquierda) expresando el gen flavonoide 3'5'-hidroxilasa de una *Viola tricolor* (pensamiento), (Chandler & Sanchez, 2012).

Desde un punto de vista comercial, el color de las flores es uno de los caracteres más importantes en muchos tipos de plantas ornamentales y cabe mencionar que la investigación basada en esta línea tiene una larga historia. La figura 1 nos muestra un ejemplo de la modificación del color en flores de *Dianthus caryophyllus* transgénico. Se han identificado los genes clave de biosíntesis de antocianinas (Nishihara & Nakatsuka, 2011; Tanaka et al., 2010), flavonoides (Ono et al., 2006; Togami et al., 2011) y carotenoides (Cazzonelli & Pogson, 2010; Sandmann, Römer, & Fraser, 2006) así como sus rutas metabólicas, permitiendo este hecho avanzar en la modificación del color floral. Se han logrado identificar los factores de transcripción de la ruta de las antocianinas

(Century, Reuber, & Ratcliffe, 2008) y, como ha sido mostrado recientemente, la regulación espacial de la biosíntesis de flavonoides (Hichri et al., 2011).

La modificación genética del color floral ha sido muy estudiada y repasada recientemente. En dichos estudios se enumeran tres métodos complementarios para manipular:

- Manipulación de pigmentos
- Acidez de vacuolas
- Transporte de iones metálicos.

La investigación acerca del color continúa, hecho que muestra la tabla 2 en la que se exponen los logros en la manipulación de la concentración y tipos de antocianinas y carotenoides.

Especies	Cambio de color	Citas
<i>Cyclamen persicum</i> (ciclamen)	Púrpura a rojo/rosa	(Boase et al., 2010)
<i>Gentiana triflora</i> (genciana japonesa)	Azul a blanco	(Nakatsuka et al., 2010; Nakatsuka, Saito, Yamada, & Nishihara, 2011)
<i>Lotus japonicus</i>	Amarillo brillante a amarillo/naranja	(Suzuki et al., 2007)
<i>Phalaenopsis</i> spp. (<i>phalaenopsis</i>)	Rosa a rosa brillante	(Chen et al., 2011)
<i>Torenia × hybrida</i> (torenia)	Azul/violeta a rosa	(Nakamura et al., 2010)
<i>Tricyrtis</i> spp. (lirio sapo)	Rojo a blanco	(Kamiishi et al., 2011)

Tabla 2. Ejemplos recientes de modificación del color floral usando modificación genética (Chandler & Sanchez, 2012).

Las dos únicas plantas ornamentales modificadas genéticamente que están disponibles en el mercado tienen flores con colores modificados y ambas han sido desarrolladas por Florigene Pty. Ltd./Suntory Ltd. (Dobres, 2011). El producto ofrecido

comprende 8 variedades de *D. caryophyllus* y una de *R. x hybrida*. La modificación del color ha sido el resultado de la manipulación de la ruta biosintética de antocianinas. En la naturaleza, *D. caryophyllus* y de *R. x hybrida* no contienen delfidina dependiente de antocianinas, debido a la ausencia del flavonoide 3'5'-hidroxilasa (Holton et al., 1993). La introducción de este gen procedente de *Petunia x hybrida* (petunia) o *Viola tricolor* (pensamiento) en conjunto con otras modificaciones endógenas a la ruta de la biosíntesis de antocianinas (para minimizar la competición por el sustrato) resulta en una acumulación de delfidina, descrita como una antocianina en flores (figura 1). La figura 2 nos muestra la producción comercial en Sudamérica de *D. caryophyllus* y *R. x hybrida* cuyo color floral ha sido modificado genéticamente.



Figura 2. Color floral modificado genéticamente en *D. caryophyllus* (clavel) y *R. x hybrida* (rosa) en Sudamérica. Las placas petri muestran la selección anual por GM en clavel (1), plantación comercial de clavel GM (2,4) y rosa (3), procesado post-cosecha de diferentes variedades de clavel GM (5) y control de la calidad post-cosecha en clavel GM (6) (Chandler & Sanchez, 2012).

1.1.2.3. *Modificación de la fragancia*

Se han identificado los genes clave relacionados con la producción (Colquhoun et al., 2010; Guterman, 2002) y la regulación (Spitzer-Rimon et al., 2010) de fragancia y esto representa, conceptualmente al menos, la posibilidad de transferir fragancias de unas especies a otras. La introducción de fragancias sin un impacto en la calidad post-cosecha ni en la productividad de ornamentales puede resultar en nuevos productos viables ya que muchas fragancias deseables son emitidas por un número limitado de especies (Potera, 2007) y debido a que algunas flores importantes de flor cortada carecen de fragancia, probablemente a causa de la selección de características como la vida en florero por los mejoradores (Gudin, 2010). La fragancia es también importante en ciertas macetas y en plantas de semillero (Saxena, Banerjee, Verma, Mallavarapu, & Kumar, 2007).

1.1.2.4. *Resistencia al estrés abiótico*

Los agricultores y los consumidores de plantas ornamentales son conscientes de que el calor, la intensidad de la luz, la humedad y el frío tienen un impacto en la producción de un producto apto o no para la venta en el mercado. La investigación con técnicas de GM para mejorar la resistencia al estrés abiótico en macetas está siendo llevada a cabo por Ornamental Biosciences (Stuttgart, Alemania), (Potera, 2007), utilizando, en este caso, genes con una implicación conocida en la tolerancia a la sequía.

Se puede conseguir aumentar la tolerancia al frío en *Petunia x hybrida* (petunia) transfiriendo el gen CBF3 de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*; (Warner, 2011), lo que potencialmente aumentaría el número de lugares en los que esta planta pueda ser cultivada.

1.1.2.5. *Resistencia a enfermedades*

Los hongos, bacterias y virus patógenos pueden acarrear efectos devastadores durante la producción, almacenamiento y distribución. Algunas plantas ornamentales o no tienen una resistencia natural muy débil o directamente pueden no tener ninguna frente a algunos de los patógenos que comúnmente se pueden encontrar en la producción y posterior distribución de las plantas además de que el control químico es un coste muy elevado para el productor asimismo como para el consumidor final.

Las enfermedades son también un problema en los cultivos destinados a la alimentación por lo que las investigaciones en materia de mejora de la resistencia a

enfermedades en la mayoría de los cultivos aún persisten. De hecho, algunos genes útiles se han encontrado en plantas ornamentales (Hammond et al., 2006; Hsiao et al., 2011). Se ha modificado la especie *Rosa x hybrida* para lograr resistencia frente a mildiu (Li, Gasic, Cammue, Broekaert, & Korban, 2003) y se ha demostrado que la producción de cafeína en una variedad transgénica *Dendranhema grandiflorum* (crisantemo) le confiere resistencia a levadura gris (Y.-S. Kim et al., 2011). Se han publicado artículos informando acerca de líneas genéticamente modificadas con resistencia a virus en la flor de maceta *Euphorbia pulcherrima* (poinsetia) y en orquídeas de flor cortada de los géneros *Phalaenopsis* spp. y *Dendrobium* spp., respectivamente (Chang et al., 2005; Clarke et al., 2008; Liao et al., 2004).

1.2. *Antirrhinum majus*, una planta modelo

La majestuosa boca de dragón (*Antirrhinum majus*) no es solo popular para los aficionados a la jardinería ya que preocupó desde bien temprano a investigadores, incluyendo a Gregor Mendel y Charles Darwin. Proveniente de la familia *Scrophularia* es nativa del oeste del Mar Mediterráneo. Desde que se le conocieran pocos usos médicos fue más demandada debido a su atractivo, sus flores correctamente simétricas a lo largo del tallo, incluso desde los primeros asentamientos romanos (figura 3).



Figura 3. Diferentes plantas de *Antirrhinum majus* (Grupo de Genética de la UCM).

Desde mediados del siglo XIX muchas variantes en cuanto a morfología y color de *Antirrhinum majus* han estado disponibles para el deleite de amantes de la jardinería

(incluyendo formas en las que los órganos reproductivos se reemplazaban por pétalos de flores adicionales, “dobles flores”), así como flores con simetría radial. Es su gran variabilidad de fenotipos y su robustez, además que tiene un ciclo de cultivo de 3 meses y la facilidad para crear cruces hacen de la boca de dragón una planta especialmente atractiva para los científicos (Schwarz-Sommer, Davies, & Hudson, 2003).

Es gracias a Erwin Baur (figura 4), el director fundador del Instituto Kaiser Wilhelm, ubicado inicialmente en Mark Brandemburgo en 1928 siendo hoy día el Instituto Max Planck para la Investigación en Mejora de Plantas situado cerca de Colonia, que la boca de dragón rosa llegara a ser uno de los más importantes organismos modelo en la primera mitad del siglo XX. Baur comenzó su trabajo en 1907 y, durante las siguientes décadas, *Antirrhinum* proporcionó profundos conocimientos en materia de genética del desarrollo. Los hitos en esta línea de investigación son: la primera conformación de un mapa de ligamiento, el descubrimiento de la herencia citoplasmática, la cuantificación de efectos medioambientales en las tasas recombinación y mutación así como la correlación entre la recombinación y la formación de quiasmas.



Figura 4. Prof. Dr. Erwin Baur, director fundador del Instituto Kaiser Wilhelm (Instituto Max Planck para la Investigación en Mejora de Plantas).

1.2.1. Cuando la genética molecular decide entrar en la floración

Antirrhinum majus proporcionó el primer acceso a todos aquellos genes que controlan el desarrollo de órganos florales (estambre, pistilo, polen y estigma) así como el

control del desarrollo foliar, del crecimiento de orgánulos y del control de la asimetría floral. Baur reconoció el potencial del campo de investigaciones de la genética de evolución y usó las bocas de dragón para identificar y mapear genes causantes de diferencias evolutivas en morfología y color de floral. La mayoría de esta investigación (todos con descripciones de más de 550 mutantes recogidos para el año 1966) fue completada por Hans Stubbe, fundador y director del Instituto de Genética de Plantas e Investigación de Cultivos para la investigación de plantas cultivadas. Esta colección clásica de *Antirrhinum* aún existe hoy día. Logró sobrevivir los efectos dramáticos del siglo XX en Europa así como el auge y caída del Telón de Acero. Aún existen más de 450 mutantes en Gatersleben. Existe también una segunda colección con más de 300 mutantes en el John Innes Centre de Norwich, Reino Unido.

Antes de 1930 el interés de los científicos residía en otros organismos modelo, como la mosca de la fruta *Drosophila* que llegó a ser la “querida del genetista”. Sin embargo, *Antirrhinum* celebró su vuelta durante la fase pionera de la biología molecular a comienzos de los años 80, cuando se descubrieron los llamados transposones. En la década de los 50, Barbara McClintock, P. A. Peterson y otros genetistas realizaron investigaciones en el maíz descubriendo que algunas secuencias de genes cambiaban su posición en el genoma muy frecuentemente y de manera completamente aleatoria. “Saltan” de un lugar a otro y pueden ayudar a genes normalmente estables a cambiar su posición. Este fenómeno se denominó transposición y los genes pertinentes transposones o “genes saltadores”.

El descubrimiento de los transposones permitió esclarecer los hechos por los cuales los invernaderos del MPI de Colonia nutrían bocas de dragón con flores moteadas o rayadas en lugar de los normales, flores de un color o varios o incluso plantas con una división floral inusual o deforme. Entre las décadas de los 50 y 70 investigadores del John Innes Centre lograron asignar las mutaciones implicadas en dos genes en particular: *NIVEA* (*NIV*) y *PALLIDA* (*PAL*). La planta necesita ambos genes para la producción de antocianinas. Los científicos mostraron que *NIV* codificaba una enzima biosintética denominada chalcona sintasa y sus correspondientes alelos diferían en su sensibilidad a la temperatura y a un estabilizador genético específico.

Ésta fue la primera pista de que estos genes llevaban diferentes transposones. Se sugirió el uso de transposones como sonda para aislar elementos transponibles. Este hecho marcó la casilla de salida para una era excitante en la investigación de plantas que

resultó en el aislamiento de una gran cantidad de diferentes transposones. El llamado etiquetado de transposones fue la mayor contribución de todos los subsecuentes estudios moleculares en plantas.

1.2.2. Lectura del control que ejercen las proteínas

En la búsqueda de aquellos genes que controlan el desarrollo floral y la morfología, los científicos se encontraron con *DEFICIENS (DEF)*, el primer miembro de una familia entera de genes. Todas las proteínas de esta familia poseen dominio de unión al DNA. Los científicos lo llamaron el cajón MADS (MADS-box en adelante). Estas proteínas, que actúan como un factor de transcripción encontrándose también presentes en otros organismos eucarióticos, controlan la transcripción de genes diana.

Durante los siguientes años, los científicos han descubierto muchas propiedades de las proteínas MADS-box en *Antirrhinum majus*, *Arabidopsis thaliana*, *Petunia hybrida*, etc. La colección clásica contenía numerosos mutantes recesivos con defectos en genes homeóticos, por ejemplo, aquellos genes que controlan el desarrollo celular durante la formación floral. Todas estas investigaciones llevadas a cabo junto con las de *A. thaliana* dieron lugar a las bases para crear el modelo “ABC de los genes de floración”, publicado en 1991. Este modelo genético proporcionó una explicación acerca de cómo se forma el órgano floral en cada uno de los cuatro anillos, llamados verticilos en una flor (figura 5). El modelo requiere sólo tres tipos de genes:

1. *Genes tipo A*. Se encuentran activos en el primer y segundo verticilo.
2. *Genes tipo B*. Regulan la formación del órgano encontrándose activos en el segundo y tercer verticilo.
3. *Genes tipo C*. Deciden el desarrollo final en el tercer y cuarto verticilo.

La pregunta que nos hacemos ahora es cómo se desarrollan cada uno de los órganos florales y quién los promueve. Pues bien, la expresión de los genes tipo A promueven la formación de los sépalos; A y B expresados de forma conjunta dan lugar a los pétalos; B y C regulan la formación de estambres; y C solamente expresado da lugar a los carpelos.

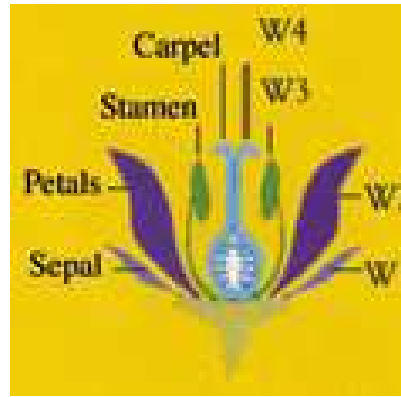


Figura 5. Diagrama de la estructura floral organizada en cuatro verticilos (whorls) (Schwarz-Sommer et al., 2003)

El éxito del modelo radica en su simplicidad y aplicabilidad a diversas especies diferentes de plantas. Investigando sobre los detalles del desarrollo de los órganos florales a nivel molecular y morfológico en *Antirrhinum* los científicos descubrieron diferencias significativas entre especies que podrían contribuir a la enorme diversidad ya existente en materia de estructura floral.

1.2.3. Un mapa de recombinación molecular para *Antirrhinum majus*

A. majus ha sido usada como sistema modelo para el estudio genético desde principios del siglo XX. Pertenece a un grupo monofilético de alrededor de 25 especies originarias de la región mediterránea teniendo todas ellas la misma dotación cromosómica ($2n = 16$) y son capaces de formar híbridos fértiles unas con respecto a otras. La mayoría de las especies son alógamas, aunque algunas líneas de *A. majus* cultivadas y silvestres son autocompatibles.

Se ha creado una colección de mutantes de *A. majus* por algunos laboratorios a partir de líneas de *A. majus* seleccionadas por su alta actividad transposónica. En muchos casos esta característica ha sido usada para clonar los genes correspondientes por etiquetado de transposones. Además, hay una colección de aproximadamente 400 mutantes, la mayoría sobre un fondo isogénico (Sippe 50). La mayoría de estos mutantes no muestra la inestabilidad genética característica de las mutaciones inducidas por transposones y, por lo tanto, ha limitado el uso del etiquetado de transposones. El aislamiento de genes por clonación posicional es posible al contar con los mapas de recombinación molecular, tanto que han permitido el reciente aislamiento del gen *fistulata* (*fis*), por ejemplo (Cartolano et al., 2007).

El mapa de ligamiento existente para *A. majus* se ha conseguido mediante el cruce de dos líneas puras, 165E y Sippe 50 (Schwarz-Sommer et al., 2010). La línea 165E fue originalmente cultivada en el Reino Unido y es fenotípicamente distinta de Sippe 50, que proviene de Alemania.

El nuevo mapa tiene ocho grupos de ligamiento y una longitud total de 562 cM estableciéndose una cobertura del 95% del genoma. Asumiendo que el tamaño del genoma es de 3.6×10^8 pares de bases, el intervalo de 2 cM representa un total de 1.28 Mbp (millones de pares de bases) de DNA. El nuevo mapa de ligamiento es un 54% mayor que el anterior mapa de *A. majus* x *A. molle* siendo la diferencia el aumento de la longitud de los ocho grupos de ligamiento excepto el 3 y el 5, que son un poco más cortos.

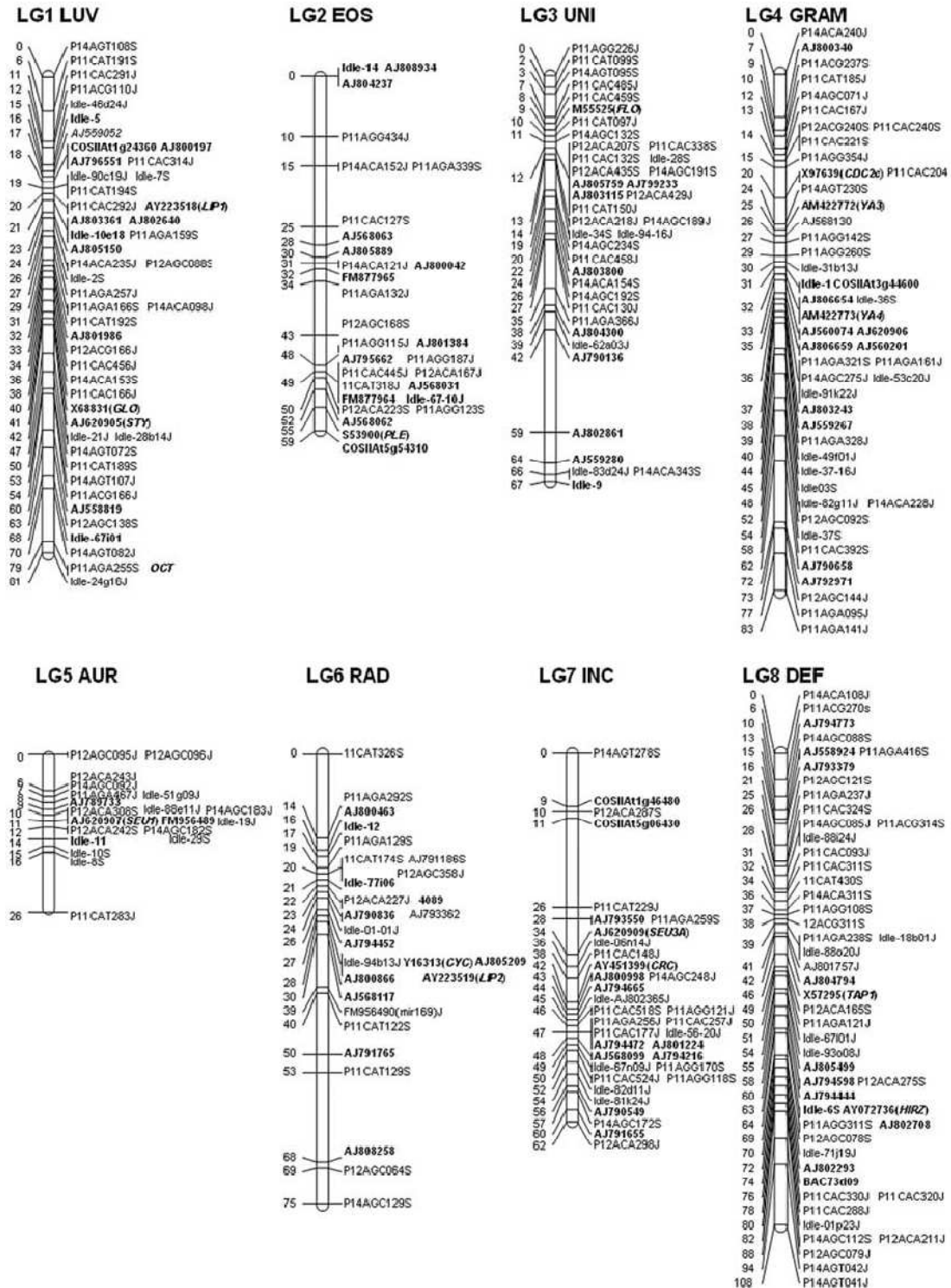


Figura 6. Mapa molecular de ligamiento de *Antirrhinum majus* Sippe 50 x 165E. Los ocho grupos de ligamiento están orientados lateralmente y numerados tal y como se hiciera en mapas de *Antirrhinum* previos. Las posiciones se han dado en centimorgans (Kosambi). Los loci de codificación de proteínas se han nombrado con el número de accesión de EMBL y con el nombre de su gen en letras cursivas (Schwarz-Sommer et al., 2010).

1.2.4. El grupo *Antirrhinum*

Las especies del grupo *Antirrhinum* se adaptan bastante bien al tipo de análisis alométricos para determinar la diferenciación de las mismas ya que sus alrededor de 25 miembros provienen de un ancestro común, probablemente de los últimos 4 millones de años (figura 7). Todas las especies tienen la capacidad para formar híbridos fértiles, permitiendo la identificación de los genes que desenmascaran sus diferencias como los QTLs.

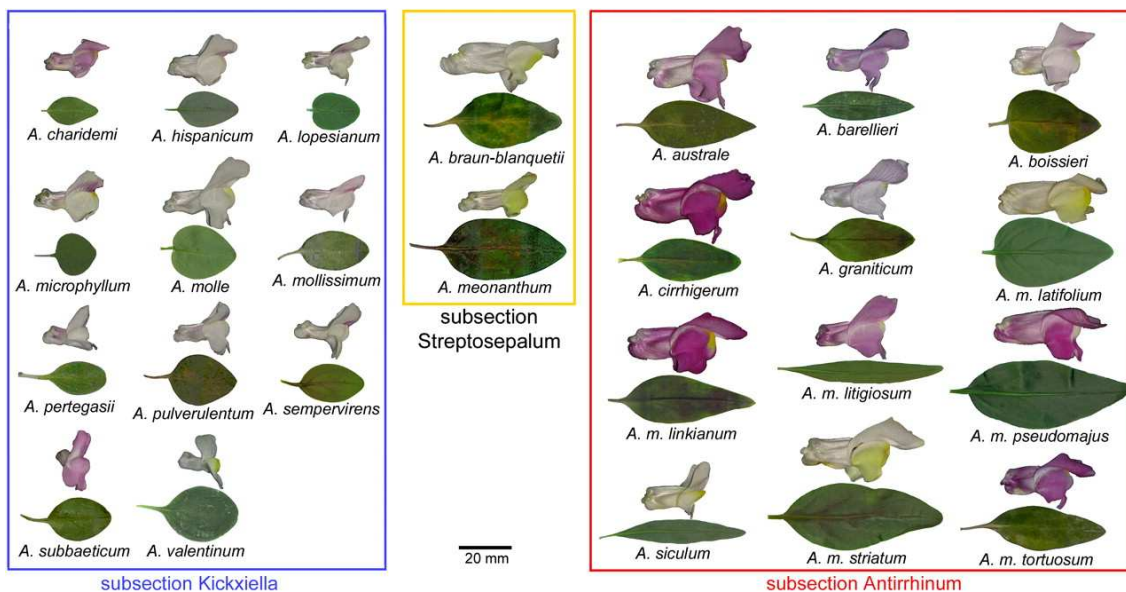


Figura 7. Subsecciones del grupo *Antirrhinum* (Feng et al., 2009).

Las especies del grupo se han dividido en tres subsecciones morfológicas:

1. La subsección *Antirrhinum* comprende las especies con hojas y flores grandes e incluye el ancestro silvestre de cultivo de *A. majus*.
2. La subsección *Kickxiella* comprende especies con flores y hojas pequeñas incluyendo a *Antirrhinum charidemi*. Esta especie es endémica del costero sureste español y, además, tiene las hojas y flores más pequeñas de las especies del grupo, sobre una décima parte del área de *A. majus* (figura 8).
3. La subsección *Streptosepalum* consiste en dos especies cuyos órganos se encuentran, en tamaño, entre las subsecciones *Antirrhinum* y *Kickxiella*.

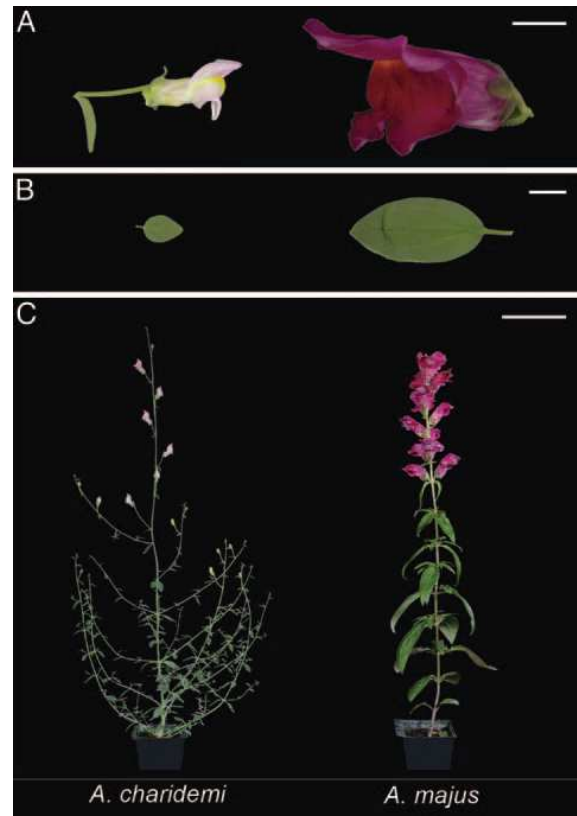


Figura 8. Comparación entre *A. charidemi* (izq.) y *A. majus* (derecha). (A) Flores individuales en vista lateral. (B) Hojas del nodo 4. (C) Plantas completas. Las barras de escala son de 1 cm para las ilustraciones A y B y de 10 cm para C (Langlade et al., 2005).

Como se puede observar en la figura 7 existe una correlación pleiotrópica positiva entre el tamaño de pétalos y hojas. Para verificar estas observaciones se llevó a cabo un estudio alométrico en el que se establecieron gráficas de correlación entre el tamaño de los pétalos y de las hojas (figura 9). Inicialmente, los estudios encaminados a la caracterización alométrica de especies consistían en cuantificar la variación alométrica midiendo los órganos (hojas y flores) por separado y comparando entre los mismos de varias especies. La desventaja resultaba debido a las condiciones climáticas de los invernaderos o medios en los que se hacían crecer ya que no todas las plantas se desarrollaban de igual forma, hablando siempre en comparaciones de la misma especie y variedad. La alternativa a este enfoque surgió de tratar los datos de estas mediciones colectivamente, es decir, midiendo las hojas frente a las flores de cada una de las plantas de cada especie y estableciendo así un índice alométrico que era independiente de lo que hubiesen crecido unas y otras (Langlade et al., 2005).

En la figura 9A se ha establecido una gráfica de correlación entre el tamaño medio del área del pétalo frente al tamaño medio del área de la hoja para cada una de las especies, mientras que en la figura 9B se ha establecido la misma gráfica de correlación para las mismas características pero, esta vez, para la población F2. En ambas ilustraciones podemos observar la existencia de una fuerte correlación positiva que existe entre los tamaños de las hojas y de los pétalos para el grupo de especies de *Antirrhinum*, reforzando, de esta manera, la división en tres subsecciones del grupo en función del tamaño de sus órganos vegetativos y generativos (Feng et al., 2009).

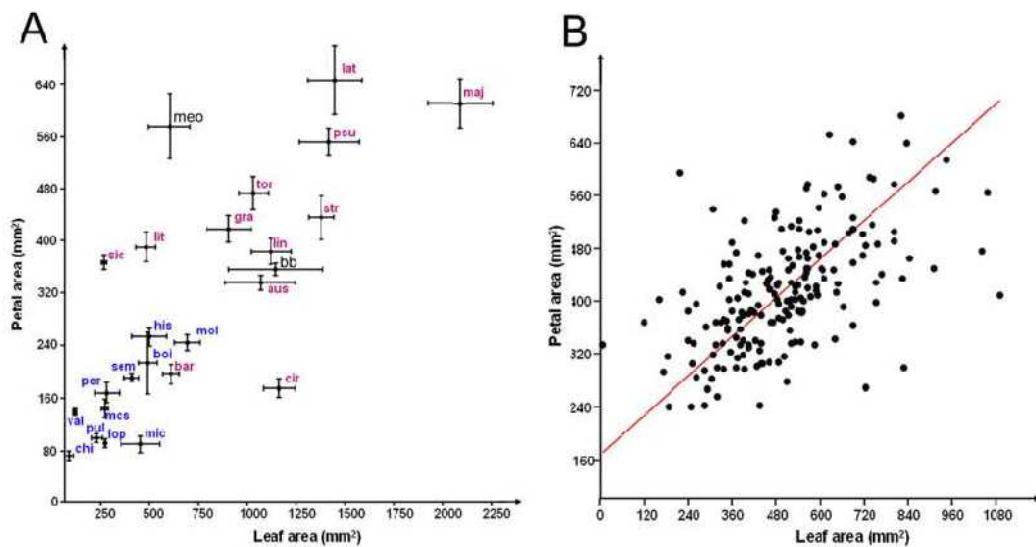


Figura 9. Correlaciones entre áreas de pétalos y hojas. (A) medio del área del pétalo frente al tamaño medio del área de la hoja para cada una de las especies ($r = 0.65$ para los individuales). Los miembros de la subsección *Antirrhinum* están mostrados en rojo, los de la subsección *Kickxiella* en azul, mientras que los miembros de la subsección *Streptosepalum* se encuentran en negro. aus = *A. australe*, bar = *A. braun-blanquetii*, boi = *A. boisieri*, chi = *A. charidemi*, cir = *A. cirrhigerum*, gra = *A. graniticum*, his = *A. hispanicum*, lat = *A. latifolium*, lin = *A. linkianum*, lit = *A. litigiosum*, lop = *A. lopesianum*, maj = *A. majus*, meo = *A. meonanthum*, mic = *A. microphyllum*, mol = *A. molle*, mos = *A. mollissimum*, per = *A. pertegasii*, psu = *A. pseudomajus*, pul = *A. pulverulentum*, sem = *A. sempervirens*, sic = *A. siculum*, str = *A. striatum*, tor = *A. tortuosum*, val = *A. valentinum*. (B) área media de los pétalos frente al área media de las hojas de la población F2. La línea de regresión del eje mayor se encuentra en rojo, $r = 0.55$ (Feng et al., 2009).

1.3. *nana^{nana}*, descubriendo al mutante

Como se ha comentado anteriormente, la colección de mutantes de *Antirrhinum majus* conocida como colección de Gatersleben fue desarrollada a partir de los estudios del Dr. Erwin Baur y sus colaboradores. Estos llevaron a cabo un análisis de mutantes entre 1910 y 1972 (Baur, 1924; Stubbe, 1974), incluyendo tests de alelismos, mutagénesis y cruzamientos con especies silvestres. Entre los mutantes identificados en el catálogo, destaca el mutante *nana* por ser una mutación de origen comercial, y cuya venta se ha venido produciendo de forma ininterrumpida desde 1896 por la empresa Vilmorin (Vilmorin, 1896). Estudios posteriores desarrollados en el grupo de Stubbe permitieron identificar un segundo alelo llamado *largiflora* (Stubbe, 1974). Esto ha llevado a renombrar los dos alelos mutantes como *nana^{nana}* y *nana^{largiflora}*.

El mutante *nana^{nana}* de *Antirrhinum majus* que fue descrito originalmente en 1896 en el catálogo de la empresa Vilmorin y hoy día aún se sigue vendiendo como Vilmorin nain, lo cual hace indicar que estamos frente a una de las variedades con más éxito en el mundo ornamental ya que cuenta con más de 115 años en el mercado.

En este estudio se ha trabajado con el primer mutante alélico de *nana* que fue descrito, *nana^{Gatersleben}*. A raíz del descubrimiento de *nana^{largiflora}* se decidió cambiar el nombre del mutante *nana* por *nana^{nana}* para que no hubiese discrepancias a la hora de la diferenciación de los mismos. A partir de ahora nos vamos a referir al mutante *nana^{Gatersleben}* como *nana* o simplemente *na*.

La estructura vegetativa de *nana* es de tipo semienano (figura 11) (Schwarz-Sommer et al., 2010). Sin embargo, un segundo alelo, *nana^{largiflora}*, que causaba un fenotipo más débil en el fondo genético de Sippe 50 (Stubbe, 1974) podría no ser distinguido del silvestre en las poblaciones F2 producidas a raíz de los cruces entre la línea 165E. Esto pone de relieve un problema que podría acarrear la supresión de un fenotipo mutante débil en distintos fondos genéticos.

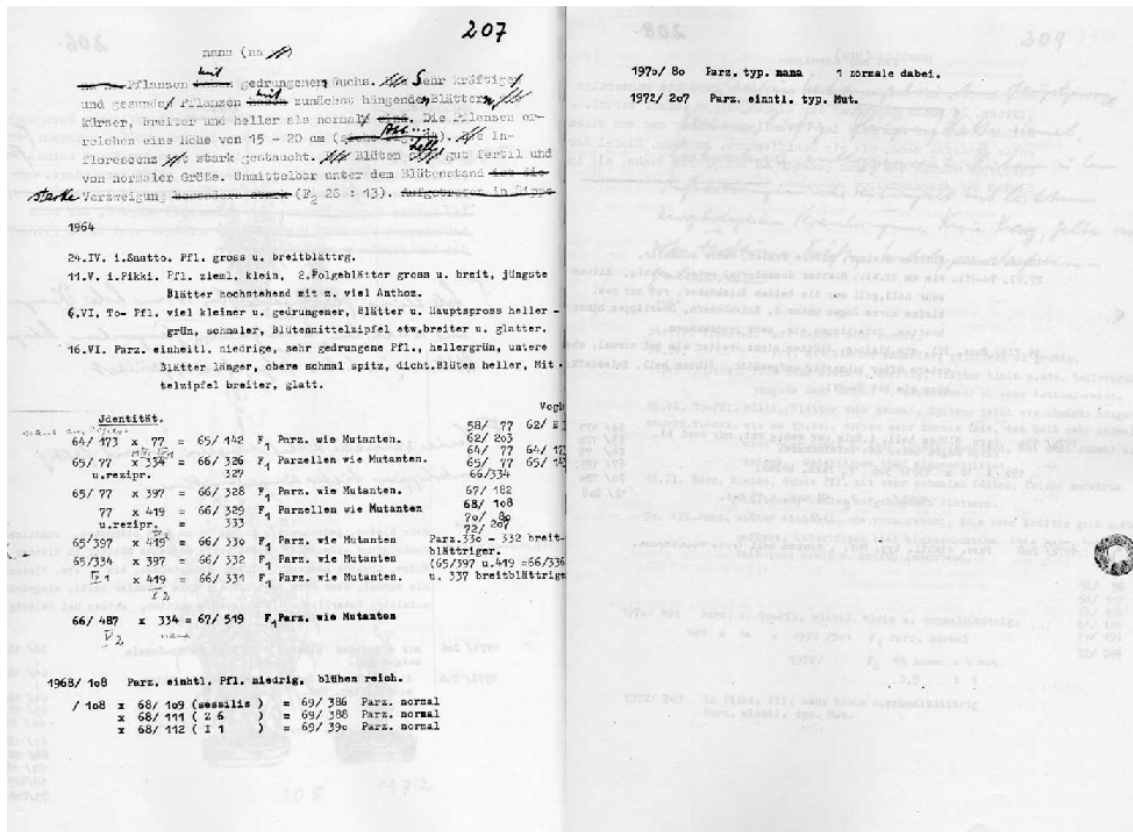


Figura 10. Notas originales del Dr. Stubbe en alemán tal y como se guardaron en Gatersleben (Stubbe, 1974).

Como ya se ha comentado, el crecimiento del mutante *nana* es mucho más lento pero las plantas crecen siendo fuertes y sanas. Las hojas están dobladas hacia abajo al principio; luego de eso son más cortas, más anchas y más ligeras que el silvestre. Las plantas alcanzan un tamaño medio de 15 a 20 centímetros y suelen tener brotes laterales justo debajo de las inflorescencias, siendo éstas mucho más cortas de lo normal (tabla 3). Las inflorescencias son ligeras y con una fertilidad y tamaño normales. La segregación de *nana* es 26:13 (Brücher, 1943; Melchers, 1939; Schick & Stubbe, 1934; Schick, 1934; Stubbe, 1933, 1966; Vilmorin, 1896).

1.3.1. Estudios llevados a cabo en el laboratorio

Buscando la forma de entender mejor con qué tipo de mutante de *Antirrhinum* se iba a trabajar en lo sucesivo en el laboratorio se determinaron una serie de estudios y parametrizaciones que nos servirían en lo sucesivo a la hora de tratar las plantas de una manera más eficiente en las etapas de crecimiento y estabilización en invernadero.

1.3.1.1. Estudio de los parámetros vegetativos

Para comenzar la caracterización del mutante *nana* se llevaron a cabo una serie de medidas sobre parámetros vegetativos de la planta frente al fenotipo silvestre. Se descubrieron diferencias significativas aplicando el test de sensibilidad de Duncan para el peso de la planta y la longitud y anchura de las hojas (tabla 3).

En las mediciones realizadas en mayo de 2003 y junio de 2006 que determinaban la longitud de las plantas hubo una diferencia significativa entre el fenotipo silvestre de mayor longitud que el mutante. El test de Duncan (Duncan, 1955), empleado para establecer diferencias significativas entre datos, corroboró estas primeras tesis.

En lo referente a la longitud y anchura de las hojas pudimos esclarecer que, aún siendo más largas las hojas del fenotipo silvestre, no existían diferencias significativas con respecto a *nana*. En contraste, el test de Duncan arrojó resultados de diferencias significativas en la anchura de las hojas. Las del fenotipo silvestre son significativamente más anchas que las de *na*.

Mes de la medida		silvestre	<i>nana</i>
Mayo 2003 (invernadero)	Longitud de la planta (cm)	28,14a	21,3b
Junio 2006 (cámara de crecimiento a baja intensidad lumínica)	Longitud de la planta (cm)	33,0a	22,0b
	Longitud de la hoja (mm)	65,1a	57,9a
	Anchura de la hoja (mm)	28,6a	24,3b

Tabla 3. Mediciones de diferentes parámetros vegetativos del mutante *nana* frente a silvestre (165E). Las diferentes letras indican diferencias aplicando el test de múltiple rango de Duncan ($p < 0.05\%$). Los datos se obtuvieron cuando se observó la aparición del primer meristemo floral.

1.3.1.2. Estudio de los parámetros florales

En este estudio se decidió llevar a cabo un examen exhaustivo del tamaño de los diferentes órganos florales entre individuos silvestres de *Antirrhinum majus* frente a los del mutante *nana* (figura 11).



Figura 11. Plantas de *Antirrhinum majus* objeto de estudio. A la derecha, uno de los mutantes seleccionados e izquierda, planta de *Antirrhinum majus nana*.

Para poder ofrecer un resultado fiable se aplicó el test de múltiple rango de Duncan (al igual que en el estudio del epígrafe anterior). De esta forma se pudieron asignar diferencias significativas para ciertas características del órgano floral (tabla 4).

Al igual que ocurría con los parámetros vegetativos se puede observar claramente que los órganos florales del mutante *nana* son, por lo general, significativamente más pequeños que los del silvestre. Estas partes de la flor que tienen una significancia en cuanto a menor tamaño son la longitud y anchura del tubo hasta la separación de los pétalos, longitud inferior de la flor, longitud de los sépalos y la longitud de los estambres superiores. El resto de órganos florales no presentan diferencias significativas pero son siempre menores con respecto al fenotipo silvestre (figura 12).

Parámetros florales	<i>nana</i>	<i>silvestre</i>	
1	15,54a	16,5b	1- Tube length
2	29,4a	32,21b	2- Lower length
3	22,1a	24,47a	3- Petal height
4	10,08a	10,73b	4- Sepal length
5	9,44a	10,92b	5- Tube width
6	36,38a	38,63a	6- Upper length
7	22,64a	24,18a	7- Lower petal expansion
8	26,64a	28,42a	8- Upper petal expansion
9	22,98,a	25,13b	9- Upper stamen length
10	19,86a	21,01a	10- Total gynoeceium length
11	13,72a	13,59a	11- Palate

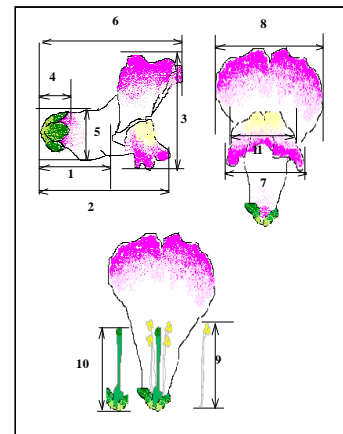


Tabla 4. Parámetros sobre el tamaño floral en *nana* vs *silvestre* (165E). Las diferentes letras indican diferencias aplicando el test de múltiple rango de Duncan ($p < 0.05\%$).

Figura 12. Características de las mediciones.

1.3.1.3. Estudio de rescate de altura mediante aplicación de GAs

Las giberelinas son una clase de reguladores de crecimiento de las plantas con más de 130 variantes identificadas desde varias fuentes, todas basadas desde la misma estructura de Gibano. La actividad de las giberelinas aplicadas exógenamente varía según el tipo de giberelina y la especie en tratamiento. La giberelina usualmente utilizada en cultivos vegetales es GA_3 , conocida también como ácido giberélico. Aunque las giberelinas tienen un importante papel en el ciclo de vida de las plantas (controlando por ejemplo el largo del tallo, la floración y la formación de frutos), en un cultivo de tejidos GA_3 generalmente se usa para estimular la elongación de los tallos o la conversión de brotes a tallos. GA_3 interfiere con la iniciación de brotes en las primeras etapas de la formación del meristemo, y puede también reducir la formación de brotes *in vitro* si se aplica a cultivos de tejido vegetal en la etapa de iniciación. Similarmente GA_3 generalmente reduce la formación de raíces y la embriogénesis *in vitro* (David & Vergara, 2009).

Los fenotipos del mutante *nana* se caracterizan por la presencia de tallos semienanos. No obstante, tras el estudio realizado pudimos observar que el mutante *nana* sufría el denominado “rescate de altura” tras la aplicación de giberelinas (figura 13). Este hecho nos dio las primeras pistas para pensar que *nana* se trataba de una mutación involucrada en la respuesta a giberelinas o en su síntesis, es decir, los resultados más manifiestos en cuanto a los estudios con giberelinas se observan cuando se aplican

giberelinas a plantas con enanismo debido a un solo gen mutante. Luego de esta aplicación dichas plantas llegan a confundirse con las normales. Este efecto tan espectacular hace pensar que el resultado de la mutación, en términos bioquímicos, ha sido una pérdida de capacidad de la planta para sintetizar sus propias giberelinas.



Figura 13. Efecto de la aplicación de GAs en silvestre frente a *nana*.

Más si cabe son las aclaraciones que ofrecen los datos de este estudio. Se ha vuelto a utilizar el test de Duncan como método para discernir entre diferencias significativas y las que no lo son. A tesón de las plantas vistas en la figura 13 podemos corroborar que existe una diferencia significativa en lo que a la longitud de los entrenudos se refiere para el mutante *nana* y su control así como para el silvestre y su control (tabla 5). Se midieron también las dimensiones de las flores pero no hubo diferencias significativas entre los individuos a los que se les había aplicado GAs y a los que no (controles).

		Control	GA+
Longitud de entrenudos (cm)	silvestre	18,8a	31,98b
	<i>nana</i>	15,9a	25,63b
Longitud de la flor (mm)	silvestre	36,38a	35,43a
	<i>nana</i>	38,63a	38a

Tabla 5. Efecto de la aplicación de GA en los parámetros vegetales del silvestre frente al mutante *nana*. Las diferentes letras indican diferencias aplicando el test de múltiple rango de Duncan ($p < 0.05\%$). La medida de la longitud de los entrenudos se corresponde con la de los siete primeros.

Actualmente se conocen los enzimas de la ruta de biosíntesis de las giberelinas, y se han aislado y caracterizado los genes de muchos de estos enzimas. Los dos puntos clave de la regulación son las enzimas biosintéticas GA 20-oxidasa (*GA20ox*) y la GA 3-oxidasa (*GA3ox*) y una enzima implicada en la inactivación de las giberelinas, GA 2-oxidasa (*GA2ox*).

1. *GA 20-oxidasa*. Cataliza todas las reacciones implicadas en las sucesivas etapas de oxidación del carbono 20 entre GA_{53} y GA_{20} , incluida la eliminación del C-20 en forma de CO_2 .
2. *GA 3-oxidasa*. Funciona como una 3β -hidroxilasa, añadiendo un grupo hidroxilo al C-3 para formar la giberelina activa, GA_1 .
3. *GA 2-oxidasa*. Inactiva GA_1 al catalizar la adición de un grupo hidroxilo al C-2 (Taiz & Zeiger, 2006).

A raíz del estudio del rescate de altura mediante la aplicación de GAs se procedió a la determinación de los niveles de expresión relativa de GA 2-oxidasa y GA 20-oxidasa (tabla 6) para el mutante *nana* frente a las mismas de un individuo silvestre. Se pudo comprobar entonces que, ya sea en días largos o cortos, o en semillas, hojas y meristemas florales, las concentraciones de estas enzimas biosintéticas que participan en las rutas de inactivación de GAs eran mayores en *nana* que en el individuo silvestre. Este estudio reveló las causas por las cuales el mutante *nana*, a nivel fenotípico, tiene un crecimiento menor (tabla 5) que el fenotipo silvestre ofreciéndonos, además, un nuevo camino por el que seguir las investigaciones.

		GA 2-oxidasa	GA 20-oxidasa
Días largos	semillas	<i>nana</i> sobreexpresado x 2,557; p = 0,1785	<i>nana</i> sobreexpresado x 1,147; p = 0,9515
	hojas	<i>nana</i> sobreexpresado x 6,874; p = 0,029	<i>nana</i> sobreexpresado x 3,147; p = 0,4425
	meristemos florales	muy débil o sin producto	<i>nana</i> sobreexpresado x 3,898; p = 0,001
Días cortos (baja intensidad lumínica)	hojas	<i>nana</i> sobreexpresado x 1,482; p = 0,352	<i>nana</i> sobreexpresado x 1,302; p = 0,501
	meristemos florales	<i>nana</i> sobreexpresado x 3,599; p = 0,502	<i>nana</i> bajoexpresado x 1,211; p = 0,9465

Tabla 6. Expresión relativa de los homólogos GA2 oxidasa y GA20 oxidasa de *A. majus nana* frente al silvestre. Los datos se normalizaron frente a ubiquitina. Se determinó que se estaba sobreexpresado o bajoexpresado con un valor p de 0.05 siendo los valores en color azul significativamente diferentes.

1.3.1.4. Estudio sobre el efecto del paclobutrazol en la tasa de germinación de semillas

El paclobutrazol es un triazol que retarda el crecimiento vegetal debido a que interfiere en la síntesis de giberelinas afectando también a otras hormonas, como por ejemplo: reduce el nivel de ácido abscísico, etileno y ácido indolacético y aumenta el nivel de citoquininas (Azcón-Bieto & Talón, 2003).

En este estudio se quiso averiguar si existía o no resistencia al paclobutrazol debido a que, como ya hemos visto en el estudio anterior, la ruta de síntesis, inactivación y/o señalizado de giberelinas parece estar afectada en *nana*.

El análisis de resistencia a paclobutrazol muestra una ligera pero significativa resistencia de *na* frente a silvestre (tabla 7).

Paclobutrazol (M)	silvestre	<i>nana</i>
0	100%	100%
10^{-8}	0%	15%
10^{-7}	0%	5%
10^{-6}	0%	0%

Tabla 7. Efecto del paclobutrazol en la tasa de germinación de semillas en silvestre frente a *nana*.

1.3.1.5. Análisis transcriptómico de *nana* indica posible función sobre el reloj circadiano

Los fenotipos anteriormente estudiados (resistencia a paclobutrazol y rescate de altura con GAs) son en principio opuestos, pues uno muestra falta de GAS (rescate de altura) y otro exceso de GAs (resistencia a paclobutrazol). De esta forma, con el objetivo de identificar que posible ruta o rutas existían que pudiesen dar información sobre tan complejo fenotipo llevamos a cabo un estudio de *nana* con micromatrices.

1.3.1.5.1. Micromatrices para la cuantificación masiva de RNAm

La metodología clásica utilizada para la detección y cuantificación de RNAm presente en una célula es el análisis por *Northern blot* donde una sonda radioactiva en solución se une con un RNAm inmovilizado en un soporte. Otro método usado es la RT-PCR, donde el RNAm es copiado a cDNA (DNA complementario) y se genera un intermediario de doble cadena por la reacción de transcripción reversa (RT) y posterior amplificación de la cadena por la reacción de la polimerasa (PCR). En estos ensayos el principio fundamental es la hibridación, que se basa en la complementariedad de las bases, pero su debilidad es la detección. En el primer caso la detección de emisión de radioactividad requiere pasos adicionales como la autorradiografía y en el mejor de los casos el escaneo con detectores de radiaciones β y γ que aumentan hasta 100 veces la sensibilidad de la técnica. En el caso de la RT-PCR los niveles de detección han aumentado significativamente mostrando en tiempo real la duplicación exacta del material inicial en la reacción de PCR por la incorporación de fluoróforos a la doble cadena naciente. Esto permite detectar cambios de dos órdenes de magnitud comparado con los geles de bromuro de etidio que manifiestan cambios de diez órdenes de magnitud.

Estas técnicas suplieron las necesidades durante muchos años pero sufren la limitación del número de genes a reportar. Actualmente se requieren de reportes globales o de miles de genes a la vez, imposibles de detectar por radioactividad, debido a que estos ensayos soportan una cierta densidad de puntos en simultáneo, o por PCR en tiempo real, dadas las limitaciones de realizar los ensayos de 96 muestras cada vez (una placa).

La palabra *microarray* (micromatriz) deriva del griego *mikro* (pequeño) y del inglés *array* (distribución ordenada). Podríamos decir que las micromatrices o microarreglos permiten el depósito de miles de puntos conteniendo genes o parte de genes sobre un portaobjetos para su estudio en paralelo. De esta manera es posible tener una visión instantánea de actividad de genomas completos o de un grupo selecto de genes.

En los estudios de *microarrays* se combinan las técnicas de hibridización de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. De esta manera, sólo en los puntos del portaobjeto donde haya ocurrido hibridización habrá fluorescencia y la intensidad de la fluorescencia detectada será proporcional al nivel de expresión del gen en estudio.

Una condición indispensable es que cada uno de los genes que esté representado sea fácilmente distinguible de otros. En otras palabras la porción del gen inmovilizada en el portaobjeto debe llevar consigo, independientemente de su tamaño, su cédula de identidad. Este punto es de especial importancia en el diseño de los *microarrays* y se basa en búsquedas exhaustivas en las bases de datos públicas (como *Unigene* y *GenBank*) y selección por ensayos de prueba y error (Barrero, 2005).

1.3.1.5.2. Resultados del *microarray*

El análisis transcriptómico se elaboró sobre el mutante *nana* en comparación con su línea parental Sippe 50. El resultado de dicho estudio mostró cambios en una serie de genes aparentemente no relacionados, pero que si que tienen en común el ser genes regulados por el reloj circadiano (tabla 8).

Gen	Expresión
<i>S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid methyltransferase (SAMT)</i>	5,692 up
<i>putative CONSTANS-like B-box zinc finger protein</i>	3,293 up
<i>Arabidopsis thaliana CDF1 (CYCLING DOF FACTOR 1)</i>	2,956 down
<i>gibberellin 2-oxidase</i>	3,662 up
<i>(LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL BINDING PROTEIN 3); K08914 light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 3</i>	10,456 down
<i>chlorophyll a/b binding protein</i>	4,106 down
<i>Benzoate carboxyl methyltransferase (S-adenosyl-L-methionine: benzoic acid carboxyl methyltransferase (BAMT))</i>	2,509 down
<i>Phenylalanine ammonia-lyase-</i>	4,438 up
<i>Benzoate carboxyl methyltransferase (S-adenosyl-L-methionine: benzoic acid carboxyl methyltransferase)</i>	1,089 up non- significant

Tabla 8. Parte del análisis transcriptómico del mutante *nana* frente a la línea parental Sippe 50. Up significa que ese gen se encuentra sobreexpresado en el mutante frente a Sippe 50 y down significa que se encuentra reprimido con respecto a Sippe 50.

2. El reloj circadiano

La Tierra rota sobre sus ejes cada 24 horas, con el resultado de que cada posición en la superficie de la tierra se da de forma alternante entre el día y la noche. Que el metabolismo, la fisiología y el comportamiento de la mayoría de los organismos cambian profundamente entre el día y la noche es obvio debido a la mayoría de observaciones que se han realizado. Estas oscilaciones biológicas se parecen a los ritmos diurnos. Es menos obvio, sin embargo, que un gran número de organismos tenga la habilidad innata de medir el tiempo. En efecto, la gran mayoría de los organismos no se limitan a responder a la salida del sol pero, más bien, anticipan la puesta de sol y ajustan su biología acorde. La adaptación de los sistemas biológicos a dichos ciclos terrestres parece haber ocurrido a través de un grupo de genes que permiten ajustar el control interno a las condiciones ambientales. Dicho sistema se conoce como reloj circadiano (C R McClung, 2011; Panda, Hogenesch, & Kay, 2002).

Cuando se priva de señales exógenas a un organismo vivo, muchos de estos ritmos persisten, indicando esto que existe un control biológico endógeno. Durante los últimos 30 años, las investigaciones en materia de biología molecular han revelado los fundamentos moleculares de un reloj circadiano tan complicado como espectacular (De Montaigne, Tóth, & Coupland, 2010).

2.1. Características del reloj circadiano

Los ritmos circadianos son los subconjuntos de los ritmos biológicos descritos en periodos definidos como el tiempo en completar un ciclo de aproximadamente 24 horas.

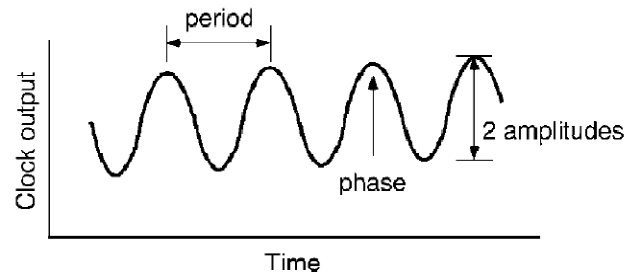


Figura 14. Nomenclatura usada para describir los ritmos circadianos (C.R. McClung, 2006).

Esta definición característica fue la que inspiró a Franz Halberg en 1959 para acuñar el término circadiano, del latín “circa” (acerca de) y diez (día). Un segundo atributo de los ritmos circadianos es que se generan de forma endógena y se sustentan de manera autónoma, pudiendo de esta forma persistir bajo las condiciones ambientales como lo pueden ser una iluminación (u oscuridad) y temperatura indeterminadas. Bajo estas condiciones controladas los organismos al verse privados de las condiciones externas se ha observado que los organismos tienden a seguir con ciclos de 24 horas. Una tercera característica de todos los ritmos circadianos es la compensación de la temperatura; el período permanece relativamente constante en un amplio abanico de temperaturas ambiente (Pittendrigh, 1954).

Sólo en circunstancias especiales, como ocurre en laboratorios, si a un organismo se priva de señales ambientales como luz y temperatura propios de la rotación terrestre y se le aplican bajo cámaras de cultivo unos nuevos (denominados zeitgebers) tienen la capacidad de resetear el reloj cada vez que recibe un estímulo aún no especificado, ya sea luz, temperatura, humedad... Esta capacidad para resetear el reloj biológico se describe en la ilustración 5 como la fase del ciclo circadiano. Por ejemplo, un pulso de luz después de la puesta de sol puede hacer incrementar la fase del reloj, sin embargo, un pulso de luz antes del amanecer también puede incrementarla. Si ese mismo pulso se da a mediodía no tendrá ningún efecto. De todo esto deducimos que, aparentemente, el reloj regula su propia sensibilidad a los estímulos ambientales. Esta variación de la sensibilidad puede ser cuantificada y graficada como una curva de respuesta en la que aparecería la variación de la fase en respuesta a los estímulos aplicados a diferentes momentos durante el ciclo circadiano (Dunlap, Loros, & DeCoursey, 2004).

2.2. El paradigma actual del reloj: bucles entrelazados retroalimentados

Con la clonación del gen *Per* de *Drosophila*, que codifica una nueva proteína de funciones desconocidas surgió inmediatamente la pregunta en materia de investigación cronobiológica “¿cómo puede el producto de este gen generar un ritmo circadiano?” Se sospechaba de la retroalimentación de los bucles para explicar una de las características más importantes de los ritmos circadianos y, de hecho, muchas observaciones sobre *per* sugirieron que se estaba en lo cierto. La cantidad de RNAm de *per* mostraba una oscilación circadiana que era seguida de oscilación desfasada en 4 horas en la concentración de la proteína PER (Hardin, Hall, & Rosbash, 1990). Tan pronto como la proteína PER se acumulaba, el RNAm de *Per* decrecía abundantemente. Esto reafirmó la sospecha de que los bucles se retroalimentaban: el gen del reloj es transcrito y más tarde el transcrito es traducido a una proteína que se acumula en el núcleo para inhibir, además, su propia transcripción. La degradación de ambos servía para renovar el ciclo.

2.2.1. El paradigma actual aplicado a plantas: el modelo del oscilador

Como se ha visto en el anterior apartado, la actual propuesta para definir la estructura del reloj circadiano consiste en bucles entrelazados y retroalimentados. Concretamente, la propuesta habla de 3 bucles entrelazados y retroalimentados de genes que actúan por activación y represión mutuas (figura 15). Estos bucles retroalimentados forman un oscilador que cicla de forma eficaz cada día a una fase y amplitud determinadas (figura 14). Como en muchos otros procesos biológicos de regulación existen, al menos, dos niveles de interacción dentro del reloj. Uno de estos es el nivel transcripcional en el que la activación y represión de genes juega un papel fundamental. El segundo nivel de interacción son los cambios post-traduccionales en los que las proteínas forman complejos que son degradados o modificados selectivamente mediante la fosforilación. Sin embargo, el reloj en plantas tiene un grado adicional de complejidad ya que existen diversos genes que forman parte del reloj y son fotorreceptores. Esto produce cambios en la conformación y actividad del reloj como resultado de la señal de entrada de luz.

En el genoma de *Arabidopsis* existen cinco genes *PSEUDORESPONSE REGULATOR*, *PRR9*, *7*, *5*, *3*, y *PRR1*, conocido más tarde como *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)* (Takata, Saito, Saito, & Uemura, 2010). Todos ellos son componentes del reloj circadiano. Tomando la mañana como el principio del ciclo diario, los primeros genes que muestran actividad en el reloj son *PRR5*, *7* y *9*. Estos genes actúan reprimiendo el siguiente bucle del reloj de tal manera que causan un retraso de la activación del reloj (Nakamichi et al.,

2009). Los factores de transcripción del dominio Myb *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* y *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED (CCA1)* forman el bucle central, por lo que se expresan durante el día. La expresión de *CCA1* y *LHY* está reprimida por *PRR5*, 7 y 9 desde la mañana hasta la noche. Esta interacción de reprimir una función que luego se reactiva crea una especie de marcapasos temporal. Un segundo componente del bucle intermedio es *TOC1*. Se ha descubierto en trabajos recientes que *TOC1* y el resto de la familia de *PRR* son proteínas de unión al DNA (Gendron et al., 2012). Este hecho indica que su función en el control transcripcional ocurre mediante la unión directa a secuencias reguladoras de los genes diana. Recientemente se ha descubierto que el gen *REVEILLE8/LIKE CCA1 LHY 5* es un factor de transcripción Myb que, además, activa a *TOC1* de tal forma que se crea una conexión entre los bucles de la mañana y la tarde (Farinas & Mas, 2011). La proteína REV8 interactúa físicamente con la región reguladora de *TOC1* activando la hiperacetilación de las histonas. Esta hiperacetilación de las histonas produce una pérdida local de la cromatina permitiendo, a su vez, una mayor accesibilidad a la maquinaria transcripcional.

El reloj de la tarde comprende los genes *EARLY FLOWERING 3 y 4 (ELF3 y ELF4)*, *LUX ARRHYTHMO (LUX)*, *GIGANTEA (GI)* y la proteína *ZEITLUPE (ZTL)* con actividad fotorreceptora. Un trabajo publicado recientemente mostraba que las proteínas *ELF3*, *ELF4* y *LUX* forman el complejo proteico denominado "Complejo de la Tarde" (Nusinow et al., 2011). Se ha demostrado que este complejo se puede unir al DNA vía *ZTL* (Helfer et al., 2011) provocando su propia represión y la del gen de la mañana *PRR9* (Dixon et al., 2011). Esta represión del bucle de la mañana mediante el bucle de la tarde cierra el círculo. Dos trabajos publicados recientemente han mostrado que *TOC1* es un represor transcripcional de los genes de la tarde (Huang, Pérez-García, et al., 2012; Pokhilko et al., 2012). Esta activación y represión mutuas de los genes del reloj crean ondas de activación y represión que regulan de manera efectiva el ritmo de la célula vegetal. De hecho, la parte del reloj de la tarde aún no es conocida completamente. Un número de componentes está por determinar y las rutas de salida del reloj casi no se conocen.

Como resumen, el reloj circadiano de plantas tiene la arquitectura de múltiples bucles retroalimentados e interconectados con cada uno. Estos bucles se han definido como el reloj de la mañana, del mediodía y de la tarde basado en el momento del día en que esos genes muestran un máximo en su expresión.

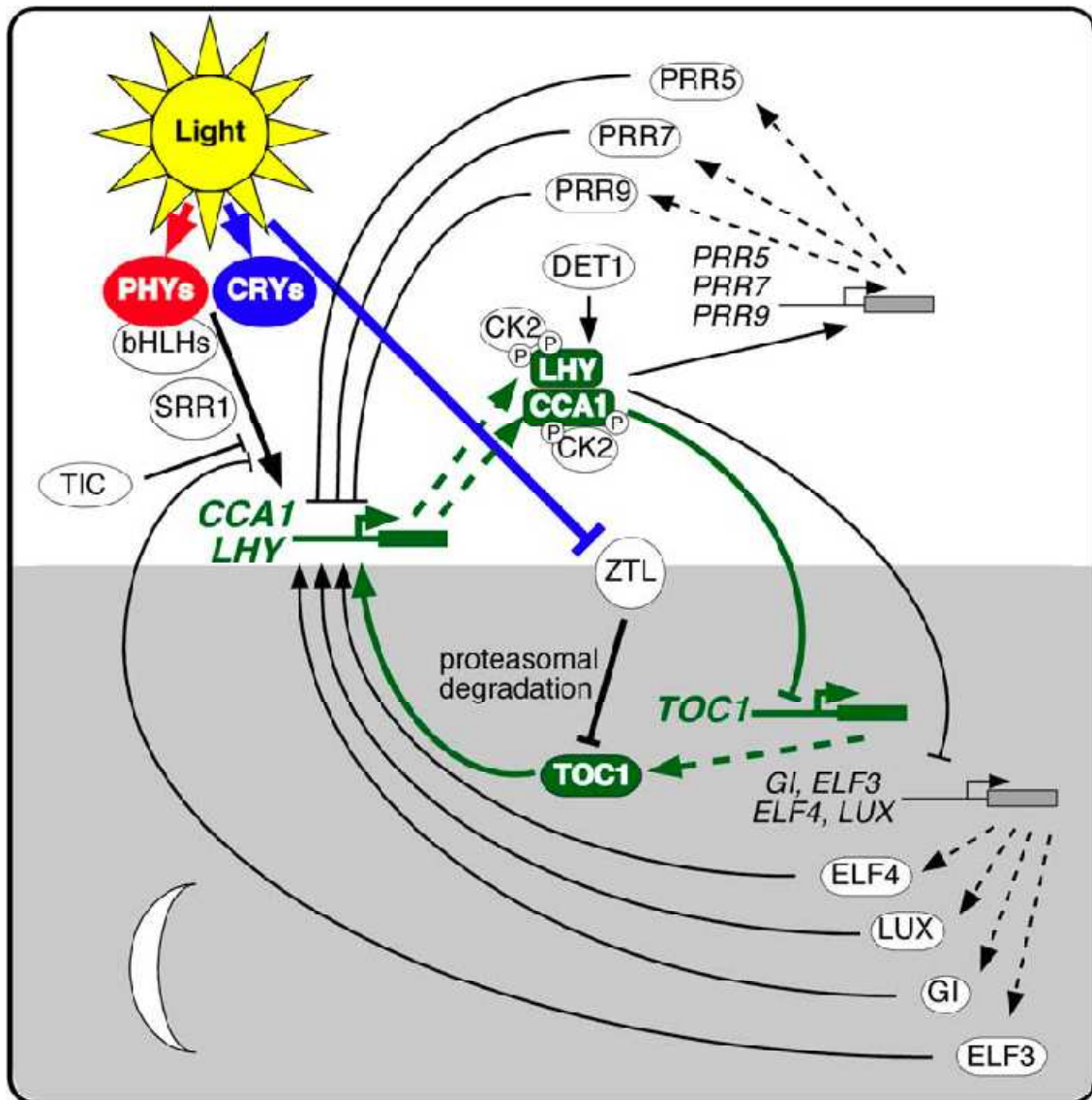


Figura 15. Modelo molecular del Oscilador Circadiano de *Arabidopsis thaliana*. Los genes están indicados mediante cajas sólidas con los nombres indicados a la izquierda. Las proteínas están indicadas mediante formas ovaladas y oblongas, con el nombre de la proteína indicado en el interior de las formas. La transcripción y traducción están señaladas mediante líneas discontinuas. La actividad de las proteínas está descrita mediante líneas solidas, con líneas que terminan en punta de flecha y líneas acabando en discontinuas perpendiculares indican acción positiva y negativa respectivamente. El bucle principal retroalimentado CCA1/LHY/TOC1 está subrayado en verde con líneas marcadas y formas cerradas. La fosforilación de LHY y CCA1 por CK2 está indicada mediante fósforos circulados P. El área sombreada marca las actividades que alcanzan un máximo durante la subjetiva noche, y el área de color blanco indica las actividades que alcanzan ese máximo durante el subjetivo día (C.R. McClung, 2006).

Gen	Locus ID	Función	Fenotipo en el reloj circadiano	
			Pérdida de función	Sobreexpresión
CCA1	At2g46830	Factor de transcripción del dominio Myb	Período corto	Arrítmico
CKB3	At3g60250	Subunidad reguladora de la caseína kinasa II	No conocido (familia del gen)	Período corto
CRY1	At4g08920	Fotoreceptor de luz azul	Período largo en luz azul	Período corto en luz azul
CRY2	At1g04400	Fotoreceptor de luz azul	Período largo en luz azul	Período corto en luz azul
DET1	At4g10180	Represor de la fotomorfogénesis	Período corto	Desconocido
ELF3	At2g25930	Desconocido	Arrítmico en luz continua	Período largo
ELF4	At2g40080	Desconocido	Arrítmico	Desconocido
GI	At1g22770	Desconocido	Período corto, baja amplitud	Período corto, baja amplitud
LHY	At1g01060	Factor de transcripción del dominio Myb	Período corto	Arrítmico
LUX	At3g46640	Factor de transcripción Myb	Arrítmico	Arrítmico
PHYA	At1g09570	Fotoreceptor de infrarrojo	Período largo en infrarrojo lejano	Período corto en infrarrojo lejano
PHYB	At2g18790	Fotoreceptor de infrarrojo	Período largo en infrarrojo	Período corto en infrarrojo
PIF3	At1g09530	Factor de transcripción básico de hélice-bucle-hélice	Silvestre	Silvestre
PRR3	At5g60100	Regulador de pseudo-respuesta	Período corto	Silvestre
PRR5	At5g24470	Regulador de pseudo-respuesta	Período corto	Baja amplitud, período largo
PRR7	At5g02810	Regulador de pseudo-respuesta	Período largo	Desconocido
PRR9	At2g46790	Regulador de pseudo-respuesta	Período largo	Período corto
SRR1	At5g59560	Desconocido	Baja amplitud	Desconocido
TIC		Gen no identificado aún	Período corto, baja amplitud	Desconocido
TOC1	At5g61380	Regulador de pseudo-respuesta	Período corto	Arrítmico
ZTL	At5g57360	Proteína de F-box	Período largo	Arrítmico

Tabla 9. Genes conocidos en *Arabidopsis* con funciones circadianas (C.R. McClung, 2006).

2.3. Señalización ambiental y ritmo circadiano

2.3.1. Luz

La luz tiene dos efectos inmediatos sobre las plantas. El primero se debe a que es la fuente de energía para la fotosíntesis y, el segundo y no menos sorprendente es que funciona como una señal que controla las reacciones de la planta con el medio que le rodea. La mayoría de los procesos fisiológicos en las plantas están controlados por la luz tal y como reflejan varios artículos basados en el estudio del fotoperiodo, fotoreceptores y desarrollo publicados en los últimos años (Fankhauser & Staiger, 2002; Franklin & Quail, 2010; Jarillo & Piñeiro, 2006; Jiao, Lau, & Deng, 2007). Gran parte de nuestro conocimiento se basa en *Arabidopsis thaliana* siendo muy escasas o prácticamente nulas investigaciones en materia de ritmos circadianos en otras plantas de importancia hortícola.

La luz se percibe en las plantas por al menos cuatro tipos de receptores, fototropinas, fitocromos, criptocromos y miembros de la familia de genes *ZEITLUPE (ZTL)/LOVKELCHPROTEIN 2 (LKP2)/FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1)*. Algunas proteínas circadianas (*ZTL* y *FKF1*) son fotorreceptores y, otras como *ELF3*, pueden formar complejos con *ZTL*. La distinción entre señal lumínica y reloj circadiano no siempre es posible y podría ser incluso algo artificial. Primero el infrarrojo activa la transcripción de los genes *CCA1* y *LHY* del reloj de la mañana (Alabadi et al., 2001), pero esta activación requiere en cierta medida la función del gen *TOC1* del reloj de la tarde (Mas, 2002). La activación de la transcripción de *CCA1* por la luz hace que se una directamente a los promotores de los genes *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)* anticipándose así a la mañana (Wang et al., 1997).

El primer gen descubierto que actúa como “zeitnehmer” (ver listado de definiciones) es *ELF3* (McWatters, Bastow, Hall, & Millar, 2000). En efecto, a los mutantes *elf3* no se les ha detectado ningún ritmo circadiano en luz continua, pero muestra ritmos circadianos en la noche (Hicks et al., 1996). La proteína *ELF3* interactúa con la proteína PHYTOCHROME B (Liu, Covington, Fankhauser, Chory, & Wagner, 2001) estableciendo un puente entre los receptores de señales de luz azul e infrarroja (Covington et al., 2001). El alelo nulo *elf3-1* muestra defectos en el bloqueo de la represión de las rutas de la luz durante la noche. Por ejemplo, *CAB* es activado por la luz durante la noche subjetiva de *elf3* pero no ocurre así en las plantas silvestres (Covington et al., 2001; McWatters et al., 2000). El concepto más importante es que los genes que son inducidos por la luz y sus

correspondientes procesos no mantienen niveles similares durante el transcurso del día y la noche porque hay una represión rítmica de la ruta de señalización de luz durante los periodos nocturnos, parcialmente controlada por *ELF3*.

Dos proteínas, ZEITLUPE (ZTL) y LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2), regulan TOC1 mediante degradación (Más, Kim, Somers, & Kay, 2003). Como la proteína LKP2 tiene propiedades para la detección de luz (Imaizumi, Tran, Swartz, Briggs, & Kay, 2003), el complejo diagrama llega a ser algo más fácil de interpretar. La luz entra en el reloj por la activación y degradación de varios componentes, logrando así una especie de input rítmico originado parcialmente por el hecho de que los componentes del reloj de la mañana y de la tarde son afectados de forma diferente; por ejemplo, la síntesis de los elementos del reloj de la mañana *CCA* y *LHY* RNAm está activada por la luz mientras que a proteína TOC1 está destinada a la degradación.

Resulta que ZTL es un receptor de luz azul ya que cuenta con el dominio LOV (luz, oxígeno, tensión) en su proteína que es un dominio de unión a flavinas. Cuando la luz está presente, la proteína ZTL se une a GI y la estabiliza, pero es selectivamente degradada en la noche. Las mutaciones en el dominio LOV hacen que la unión entre ZTL y GI sea débil (W.-Y. Kim et al., 2007). La estabilidad de ZTL es importante pues controla los niveles de proteína de TOC1 (Fujiwara et al., 2008).

La conclusión es que hay al menos tres lugares en los que el reloj circadiano interactúa con las rutas de señalización de luz: la primera mediante la interacción CCA1/PHYB, la segunda también depende de PHYB; por ejemplo ELF3/PHYB y, la tercera, mediante ZTL y FKF1 como fotorreceptores y genes del reloj. Las señales de luz por la mañana mejoran la transcripción de otros genes mientras que la luz de la tarde es interpretada como la degradación de las proteínas de los componentes del reloj.

2.3.2. Temperatura

Como las plantas no controlan la temperatura de sus órganos de una manera activa, los cambios en la temperatura del medio que les rodea tienen varios efectos paralelos en las plantas. Primeramente, muchas reacciones bioquímicas tienen una dependencia lineal en la temperatura. El así llamado Q10 o coeficiente de temperatura mide la tasa de cambio en las reacciones como resultado del incremento de la temperatura en 10°C. De hecho, las reacciones bioquímicas tienen una cierta temperatura óptima, que casi nunca se mantiene durante largos períodos en las plantas ya que la temperatura del

día fluctúa siendo, para un día determinado, de tres o cuatro horas el tiempo durante el cual la temperatura se mantiene constante. Por otra parte, las temperaturas extremas causan daños y la aclimatación al frío o al calor produce la activación de los también llamados procesos genéticos de aclimatación. Finalmente la temperatura juega un papel importante como señal en procesos de desarrollo que incluyen la germinación de semillas, crecimiento, dormancia invernal y floración. De esta forma se describen podrían ser vistos los períodos cortos (horas), períodos medios (días-semanas) y períodos largos (semanas-meses) provocados por la respuesta a la temperatura.

Estudios realizados en *Drosophila* y *Neurospora*, dos organismos que, como las plantas son poikilotérmicos (ellos no controlan la temperatura del cuerpo), lo que indica que un aspecto intrínseco de los relojes biológicos es la compensación de temperatura que permite procesos biológicos para mantener un ritmo tan autónomo como les sea posible. La identificación de los mutantes de compensación de temperatura en *Arabidopsis thaliana* se realizaron por análisis de las variaciones en la accesión específica en el patrón de compensación de temperatura para los ritmos de movimientos de hojas entre los ecotipos *Columbia (Col)* y *Landsberg erecta (Ler)* y entre *Ler* y las Islas Cabo Verde (*Cvi*). Este estudio identificó varios loci de rasgos cuantitativos (QTL) y algunos de ellos se correspondían a genes circadianos ya conocidos (Edwards, Lynn, Gyula, Nagy, & Millar, 2005). Un QTL estaba emparejado al *Flowering Locus C* (Edwards et al., 2006). Tal es que a 27°C, una temperatura bastante alta para *A. thaliana*, *FLC* alarga el período circadiano compensando, de esta forma, la excesiva velocidad de los procesos metabólicos. En cambio, el gen *GIGANTEA (GI)* era necesario para mantener la ritmicidad a 12°C y a 27°C (Gould et al., 2006), indicando que varios genes del reloj son responsables de la compensación de temperatura. Los genes *PRR3*, *PRR5* y *PRR9* forman el bucle de la mañana y *PRR7* y *PRR9* están involucrados en la compensación a altas temperaturas, como el mutante *prp7*, el mutante *prp9* sobrecompensa a 30°C indicando que están involucrados en la represión de un reloj de otro modo acelerado en estas condiciones (Salomé, Weigel, & McClung, 2010).

2.4. Floración y ritmo circadiano

La floración en plantas se encuentra entre los rasgos más importantes en la horticultura. Varios trabajos en *Arabidopsis thaliana* han mostrado que existen muchas rutas que pueden promover la floración incluyendo la rutas metabólicas de las giberelinas, el fotoperiodo, temperatura o incluso el mismo crecimiento vegetativo (Simpson, Gendall,

& Dean, 1999). Como resultado de anteriores estudios, hoy día, el conocimiento sobre la floración se encuentra dividido entre las rutas “dependiente”, por ejemplo: GAs-dependiente, luz-dependiente y temperatura-dependiente así como de una ruta autónoma para la floración. Una de las hipótesis actuales es la de que estas diferencias entre las plantas relatan el grado de importancia que tienen esas rutas en la floración. Esta hipótesis se basa en los estudios realizados en muchas de las plantas conocidas como el tomate, una planta de día neutro que sigue una ruta autónoma (Lifschitz & Eshed, 2006; Lifschitz et al., 2006). Por otra parte, el arroz es una planta de día corto y florece de una manera diferente a *Arabidopsis* (Tsuji, Taoka, & Shimamoto, 2011).

Tal y como muestran algunos mutantes de *Arabidopsis* afectados en la ruta fotoperiodo-dependiente se demuestra que son genes del reloj, quedando claro que, al menos, esta ruta está regulada por el reloj circadiano (Hayama & Coupland, 2003). De entre los genes involucrados en la floración de *Arabidopsis* se encuentran *ELF3*, *ELF4*, *CCA1*, *LHY* y *GI*. Existe pues una fuerte evidencia de que el reloj circadiano se encuentra involucrado en la floración. La identificación de *PDD-H1*, el ortólogo de *PRR7* en la cebada, como factor determinante en la floración y, parcialmente, responsable de los genotipos de verano e invierno, indican así que los genes del reloj juegan un papel fundamental en la floración de las monocotiledóneas. Se han logrado identificar ortólogos de *GIGANTEA*, un gen del bucle de la mañana, en guisante y soja (Hecht et al., 2007; Watanabe et al., 2011) indicando que esta parte del bucle podría haberse conservado entre *Arabidopsis* y leguminosas. El gen del bucle de la tarde *ELF3* también tiene una serie de funciones conservadas en *Arabidopsis*, cebada y arroz en las que muestra cambios en la respuesta al fotoperiodo (Fu et al., 2009; Saito et al., 2012). Finalmente, *GHD7*, un gen con una secuencia homóloga a la familia PRR, ha sido encontrado en arroz incrementando su rendimiento y provocando fenotipos adicionales (Xue et al., 2008). Estos datos muestran que un gran número de genes del reloj circadiano juegan un papel fundamental en floración y, en algunos casos, tienen ciertas funciones adicionales relacionadas con el crecimiento y la productividad.

Uno de los outputs del reloj circadiano mejor conocidos es la activación de la floración mediante el gen *CONSTANS (CO)*. Durante la tarde de los días largos se produce un incremento en los niveles de RNAm de *CO* resultado de la inhibición de *CYCLING DOF FACTOR* por *GIGANTEA*. Esto permite la formación de la proteína de *CO* que activa el gen *FLOWERING TIME (FT)*.

El gen *CO* activa la transcripción de *FT*, creyéndose actualmente que se trata de la señal de la floración (Samach, 2000; Suárez-López et al., 2001a). El gen *FT* de *Arabidopsis* está expresado en el tejido vascular pero la proteína se exporta fuera y viaja hasta el SAM donde activa el programa de la floración. Ha quedado empíricamente demostrado como la señal de *FT* puede ser transmitida desde las raíces hasta los brotes en tomate, una planta de día neutro (Lifschitz et al., 2006), y en *Arabidopsis*, una planta de día largo (Corbesier et al., 2007). Aunque el arroz es una planta de día corto, *FT* es la señal de floración conservada (Tamaki, Matsuo, Wong, Yokoi, & Shimamoto, 2007). Además, la sobreexpresión de *FT* en manzana (*MdFT1*) y álamo tiene como efecto una floración extratemprana, tal y como las mananas que florecen directamente en cultivos in vitro (Tränkner et al., 2010). La proteína *FT* activa, entre otros genes, el gen *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1)* que está involucrado junto con otros genes en la activación de los procesos de floración (Lee & Lee, 2010; Samach et al., 2000).

Los experimentos que se están realizando alrededor de estos procesos están brindando nuevas vías para conocer mejor fenómenos como la alternancia de producción en árboles frutales (Monselise & Goldschmidt, 1982). Un trabajo reciente realizado en mandarinas de la variedad Moncada ha demostrado que el período de cosecha de la fruta así como la producción afectan directamente a la expresión de *SOC1* (Muñoz-Fambuena et al., 2011). Esto nos ofrece de primera mano una explicación mecánica de cómo el medio ambiente influye en los árboles frutales abriendo, así, un nuevo enfoque para mejorar y homogeneizar los rendimientos. La evidencia acumulada de que el reloj circadiano juega un papel importante en la regulación de la floración y los demás procesos relacionados para los cultivos, especialmente en árboles, tiene unas implicaciones significativas en el mundo de la horticultura y la fruticultura.

El efecto de la ganancia o pérdida de función de los genes centrales del reloj circadiano y sus ortólogos en relación a la floración de plantas de una determinada importancia agrícola está emergiendo a una gran velocidad en cultivos como los cereales, leguminosos y frutales. Claramente existe un enorme vacío entre lo que conocemos de *Arabidopsis* y lo que es conocido de otras plantas pero, la evidencia del papel fundamental del reloj circadiano en la floración parece ser universal.

3. Objetivo del proyecto

3.1. El mutante *nana* como paradigma de producto agrícola exitoso

El interés del grupo de investigación por el mutante *nana* en un principio radicaba en su fenotipo floral que provocaba una disminución relativamente débil del tamaño en el alelo *largiflora*. Sin embargo, el número de fenotipos adicionales identificados en diversos trabajos fin de carrera desarrollados en el grupo nos hicieron pensar en la importancia de dicho mutante para entender el proceso de floración. Entre los fenotipos de *nana* (epígrafe 1.3.1.) se encuentran:

- Tamaño de flor ligeramente modificado
- Floración temprana independiente de fotoperiodo
- Velocidad de germinación superior al silvestre
- Tamaño de tallo semienano
- Capacidad de producir tallos de longitud silvestres tras aplicación de giberelinas
- Alta velocidad de germinación resistente a paclobutrazol en comparación con silvestre.



Figura 16. Fenotipos de *Antirrhinum majus*. En la imagen de la izquierda, de izquierda a derecha: cuatro *Antirrhinum majus* de una de las líneas silvestres y cuatro mutantes *nana*. En la imagen de la derecha, de izquierda a derecha: cuatro *Antirrhinum majus* de una de las líneas silvestres y cuatro mutantes *nana* nuevamente.

3.2. El reloj circadiano de *Antirrhinum majus*

Como objetivo secundario del trabajo, pero no menos importante en su trasfondo científico, se pretende dar una primera visión acerca del funcionamiento circadiano *Antirrhinum majus*. Para ello contamos con un gen integrado en el reloj *TOC1*, y dos que actúan aguas abajo del mismo, *CAB* y *CO*.

3.3. *Antirrhinum majus nana* y el reloj circadiano

Los fenotipos descritos en el punto anterior y que hacen referencia a los estudios del laboratorio ya abordados (epígrafe 1.3.1.) nos hicieron sospechar que el mutante *nana* era pleiotrópico. Así que, para poder discernir cuál sería el camino a tomar para continuar las investigaciones con este mutante, decidimos llevar a cabo un estudio con micromatrices (tabla 8). Dicho estudio reveló la existencia de niveles significativamente diferentes con respecto a la línea parental Sippe 50 en relación a unos genes identificados en *Arabidopsis thaliana* como regulados por el reloj circadiano.

El objetivo del proyecto radica, a partir de entonces, en verificar si el mutante *nana* de *Antirrhinum majus* está afectado realmente (o no) en los genes del reloj circadiano mediante la utilización técnicas de biología molecular y una serie herramientas matemáticas para poder tratar los datos obtenidos de una manera objetiva. El hecho de que el mutante *nana* pudiese estar afectado en el ritmo circadiano nos daría una primera explicación acerca de por qué presenta tales fenotipos diferentes de los del silvestre ya que, como hemos visto también en puntos anteriores, los genes reguladores del reloj circadiano intervienen en la mayoría de los procesos fisiológicos.

Además del proyecto en su esencia, el proyecto fin de carrera constituye el último elemento de la formación universitaria de un estudiante de ingeniería agronómica en este caso. Ocurre que, partiendo de la premisa formativa, podemos hablar de que los objetivos del proyecto radican en la familiarización de las técnicas de biología molecular que se van a describir en puntos posteriores para la obtención de los datos que luego van a ser manejados por programas de carácter matemático y que, en una segunda etapa del proyecto, nos ofrecerán los resultados para poder confirmar que el principal objetivo del proyecto se ha cumplido.

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal

El material vegetal con el que se realizó el estudio tuvo como protagonistas a la línea *Antirrhinum majus Nana* y a la línea que va a ser objeto de estudio, el mutante *Antirrhinum majus nana*. La plantación se realizó el 20 de noviembre de 2010.

El recipiente contenedor de las semillas constaba de 20 habitáculos de 5x5x5 (largo, ancho, alto) y, en cada uno de ellos, se vertieron dos o tres semillas de *A. majus*.

La plantación de ambas líneas se realizó en uno de los dos invernaderos que tiene asignado el Área de Genética del departamento de Ciencia y Tecnología Agraria de la Escuela de Ingeniería Agronómica, dependiente, a su vez, de la Universidad Politécnica de Cartagena en la Estación Experimental Tomás Ferro de La Palma, en el municipio de Cartagena (figura 17).



Figura 17. Invernaderos del laboratorio. Estación Experimental Tomás Ferro.

4.1.1. Descripción taxonómica

El nombre de *Antirrhinum majus* deriva del griego *anti* = “como”, y *rhinon*= “nariz”, a causa de que las flores de esta planta parecen que tienen forma de nariz y *majus* del

epíteto latino que significa "mayor." *Antirrhinum majus* fue descrita por Carlos Linneo y por primera vez publicada su descripción en su obra *Species Plantarum* (figura 18).

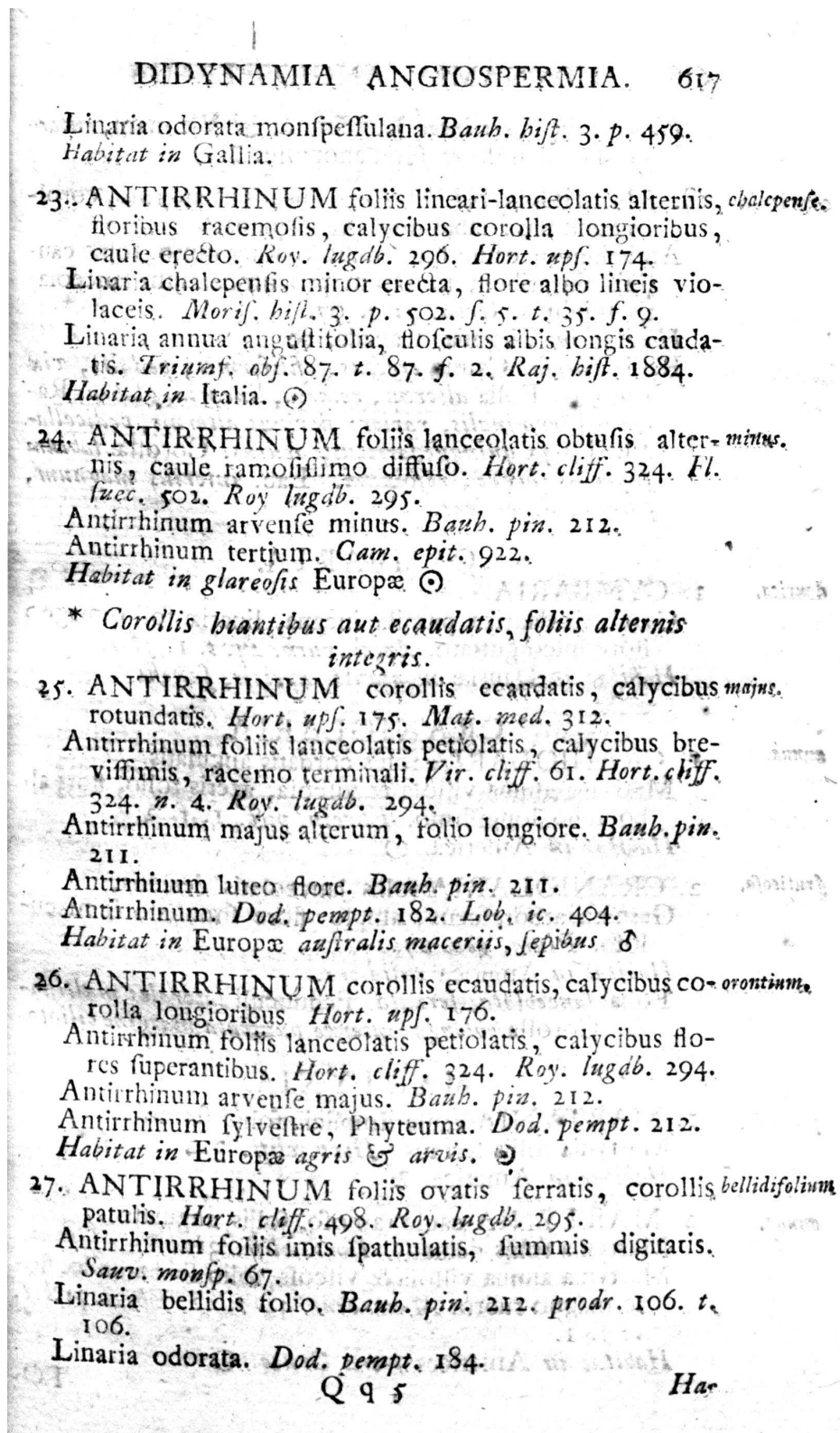


Figura 18. Primera descripción publicada de *Antirrhinum majus* (Linneo, 1753).

Hay 5 subespecies:

- *Antirrhinum majus* subsp. *majus*. Sur de Francia, noreste de España.
- *Antirrhinum majus* subsp. *cirrhigerum* (Ficalho) Franco. Sur de Portugal, sudoeste de España.
- *Antirrhinum majus* subsp. *linkianum* (Boiss. & Reut.) Rothm. Oeste de Portugal (endémica).
- *Antirrhinum majus* subsp. *litigiosum* (Pau) Rothm. Sudeste de España aunque también se han encontrado en el oeste del mismo país.
- *Antirrhinum majus* subsp. *tortuosum* (Bosc) Rouy.

4.1.2. Descripción botánica

En cuanto a su descripción botánica podemos decir que esta planta es bienal hasta perenne, con un porte de unos 1,5–2 m de altura. La base o tallo es algo leñosa y más o menos ramificada se prolonga ascendente hasta recta. En cuanto a su textura es desigualmente vellosa y glandulosa. Las hojas inferiores se encuentran opuestas, mientras que las superiores se alternan a lo largo del tallo siendo, además, lineares, con un tamaño de 1–7 cm de largo y 1–25 mm de ancho. Las mismas son sésiles, de márgenes enteros y de base acunada. Las inflorescencias se encuentran en racimos terminales cuyo cáliz, de hasta 8 mm de largo, cuenta con sépalos de igual longitud, desde oblongos hasta anchos. La corola es rojo púrpura, con unas dimensiones de hasta casi 5 cm de largo así como un labio superior bilobado y uno inferior dividido en tres partes. El tubo corolino se encuentra cerrado por 2 prominencias abultadas conteniendo también 4 estambres. La cápsula se extiende hasta los 14 mm de largo, de textura glandulosa hasta glabra, oblonga y con tres poros (figura 19).

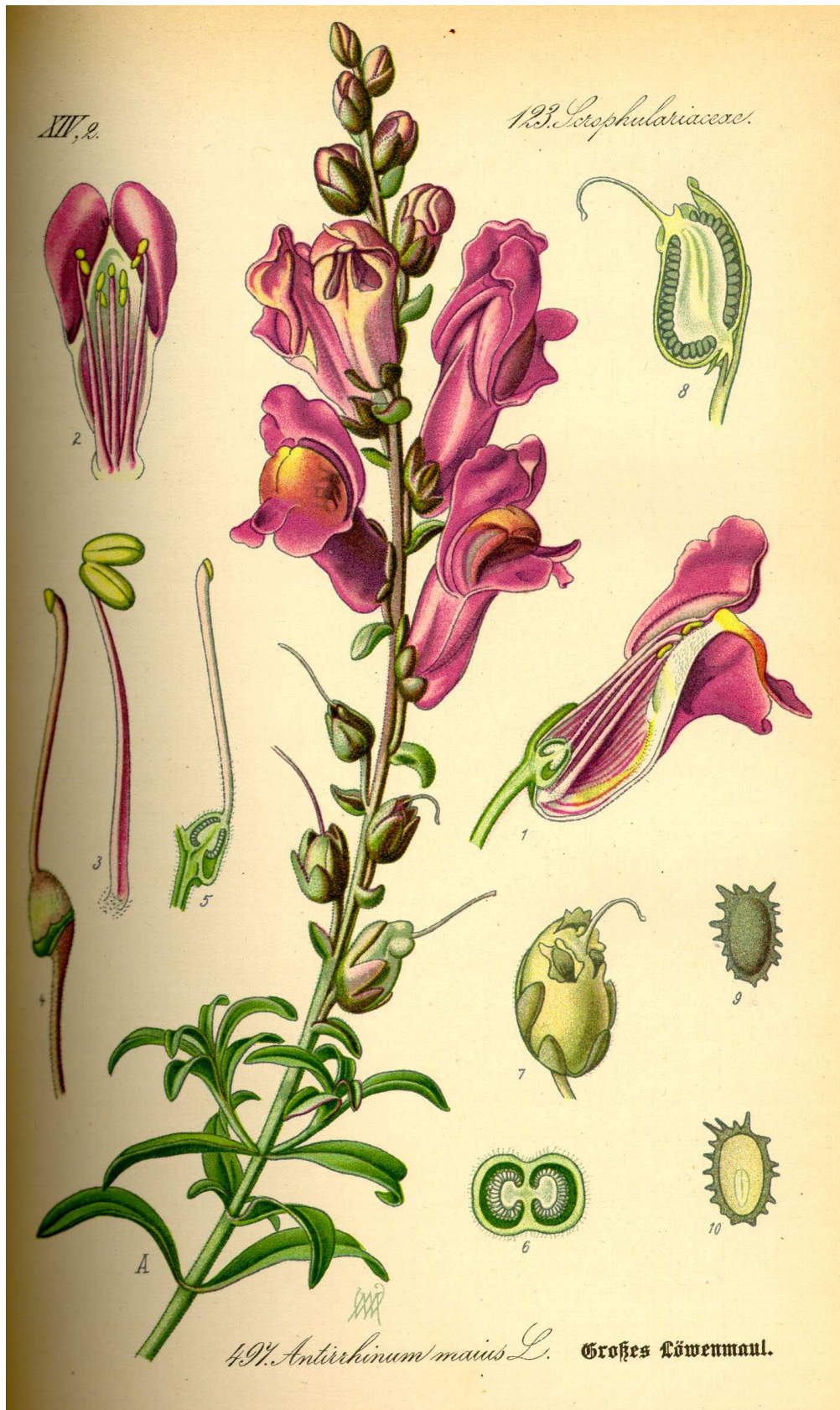


Figura 19. Descripción botánica de *Antirrhinum majus* (Thomé, 1885).

4.2. Condiciones de crecimiento

El invernadero en el que tuvo lugar la plantación y posteriores fases fenológicas de las plantas es de tipo túnel. Cuenta con una superficie total de 240 m² de los cuáles 40 m² corresponden a zonas de pasillos y puertas de entrada por lo que el área funcional del invernadero se reduce a 200 m². Dispone de sistemas de refrigeración por paneles evaporantes controlados mediante termostatos regulables, sistema de riego por goteo y aspersión, film de polietileno y 2 ventilaciones cenitales de apertura manual.

Tras cuatro semanas de crecimiento y enraizamiento se procedió al trasplante individual de las plantas, tanto silvestres como mutantes, a macetas de policloruro de vinilo (PVC) que cuentan con 144 cm² de superficie y un volumen de 1250 cm³ que, a la postre, serían las que soportarían el restante ciclo de cultivo.

Se utilizó en ambos casos un sustrato compuesto por turba, perlita y fibra de coco, al 75, 15 y 10 por ciento respectivamente.

En lo referente al control climático, el termostato del panel evaporante se fijó a 25 °C aunque no fue necesario ya que en ningún día se sobrepasó dicha temperatura. Fue necesaria la apertura de las ventanas cenitales de forma periódica para renovar el aire del interior del invernadero.

En cuanto al diseño agronómico, es decir, al cálculo de las necesidades hídricas del cultivo, se llevó a cabo una recopilación de datos climáticos obtenidos mediante el Sistema de Información Agraria de Murcia (SIAM), dependiente del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario (IMIDA). Dichos datos, que fueron obtenidos con carácter diario, en formato de media semanal durante el transcurso del establecimiento del cultivo (tabla 10). De esta forma se calcularon las necesidades hídricas del material vegetal para cada semana pudiendo variar el correspondiente volumen de riego.

El establecimiento del ciclo del cultivo hasta el traslado a las cámaras de cultivo tuvo una duración total de 12 semanas. Momento en que las plantas contaban con un porte de unos 25 cm. Tamaño suficiente para no producir demasiados daños a las plantas a la hora de la tomar las muestras.

ESTACIÓN	MUNICIPIO	PARAJE	FECHA	HRMED (%)	RDNAETA (MJ/m2)	TMAX (°C)	TMED (°C)	TMIN (°C)	VVMED (m/s)
CA12	Cartagena	La Palma	1ª semana	73,65	2,49	15,21	10,53	6,18	1,49
CA12	Cartagena	La Palma	2ª semana	75,19	2,21	11,77	7,19	3,24	1,49
CA12	Cartagena	La Palma	3ª semana	82,34	2,43	19,23	12,84	7,07	1,59
CA12	Cartagena	La Palma	4ª semana	77,25	2,04	12,29	7,22	2,97	1,56
CA12	Cartagena	La Palma	5ª semana	63,31	1,86	14,50	9,63	5,51	2,51
CA12	Cartagena	La Palma	6ª semana	80,76	2,24	14,33	8,25	3,20	1,12
CA12	Cartagena	La Palma	7ª semana	80,56	2,38	16,79	9,92	4,31	1,32
CA12	Cartagena	La Palma	8ª semana	73,51	2,56	17,30	11,22	5,26	1,38
CA12	Cartagena	La Palma	9ª semana	75,67	2,75	12,23	7,52	3,50	1,62
CA12	Cartagena	La Palma	10ª semana	77,12	3,08	12,32	8,50	5,18	2,06
CA12	Cartagena	La Palma	11ª semana	63,85	3,81	15,53	8,90	3,57	1,91
CA12	Cartagena	La Palma	12ª semana	75,50	4,70	15,75	8,83	2,88	1,52

Tabla 10. Datos climáticos obtenidos semanalmente durante el período de crecimiento de las plantas necesarios para el cálculo de las necesidades hídricas del cultivo. Estos datos fueron obtenidos de la estación agrometeorológica del SIAM en La Palma, Cartagena.

Con los datos obtenidos semanalmente de la estación agrometeorológica del SIAM en La Palma, Cartagena (tabla 10), procedemos al cálculo de los valores de la evapotranspiración de referencia (ET_0) y la evapotranspiración real del cultivo (ET_c). Estos valores nos indican cual es la tasa transpirativa de un cultivo de césped bajo y de nuestras plantas en concreto, respectivamente (tabla 11).

La FAO propuso en 1998 calcular la ET_0 con la fórmula de Penman-Monteith, aplicada a una superficie ficticia de cultivo de 0,12 m de altura, con una resistencia de superficie de 70 m/s^{-1} y un albedo de 0,23. En este caso se ha realizado el cálculo con dicha fórmula (ecuación 1).

$$ET_0 \left(\frac{\text{mm}}{\text{día}} \right) = \frac{0,408\Delta Rn + \gamma \frac{900}{T_a + 273} u_2 (e_a^* - e_a)}{\Delta + \gamma (1 + 0,34u_2)} \quad (1)$$

ESTACIÓN	MUNICIPIO	PARAJE	FECHA	ET_0 PM-FAO (mm)	ET_c (mm/día)
CA12	Cartagena	La Palma	1ª semana	0,72	0,07
CA12	Cartagena	La Palma	2ª semana	0,59	0,10
CA12	Cartagena	La Palma	3ª semana	0,71	0,19
CA12	Cartagena	La Palma	4ª semana	0,56	0,24
CA12	Cartagena	La Palma	5ª semana	0,69	0,43
CA12	Cartagena	La Palma	6ª semana	0,60	0,41
CA12	Cartagena	La Palma	7ª semana	0,67	0,48
CA12	Cartagena	La Palma	8ª semana	0,75	0,54
CA12	Cartagena	La Palma	9ª semana	0,71	0,62
CA12	Cartagena	La Palma	10ª semana	0,80	0,72
CA12	Cartagena	La Palma	11ª semana	1,09	0,99
CA12	Cartagena	La Palma	12ª semana	1,25	1,28

Tabla 11. Evapotranspiración de referencia (ET_0) y evapotranspiración del cultivo calculada semanalmente para el ciclo de cultivo (ET_c).

Siendo u_2 la velocidad del viento medido a 2 m, en m/s^{-1} ; $e_a^* - e_a$, el déficit de saturación en kPa; Δ , la pendiente de la curva de saturación en $kPa/^\circ C^{-1}$; γ , la constante psicrométrica en $kPa/^\circ C^{-1}$ y; Rn , la radiación neta expresada en MJ/m^2 .

Los datos que se muestran para la velocidad del viento (VVMED) se corresponden con los tomados en el exterior por lo que, atendiendo a la baja estanqueidad del invernadero, se optó por una reducción del 85 por ciento. El rango medio de velocidades que nos encontramos en un invernadero de características similares al nuestro se encuentran entre 0,3 y 0,6 m/s (Guzmán & Rodríguez, 2010). Así que atendiendo a los valores diarios de velocidades medias del viento e identificando el mayor valor, se pudo comprobar que existía un rango de reducción entre el 90 y el 80 por ciento.

Una vez obtenidos los valores de la ET_0 (ecuación 1), se adaptaron a las condiciones de nuestro cultivo (ecuación 2). En las figuras 20 y 21 se muestran los distintos factores que influyen en el cálculo de la ET_c .

$$ET_c \left(\frac{mm}{d} \right) = ET_0 K_c K_L K_a \quad (2)$$

Siendo ET_0 , la evapotranspiración potencial del cultivo en $mmm/día^{-1}$; K_c , el coeficiente de cultivo (figura 20); K_L , el coeficiente de localización (figura 21) y; K_a , el coeficiente de advección, fijado en un 95 por ciento.

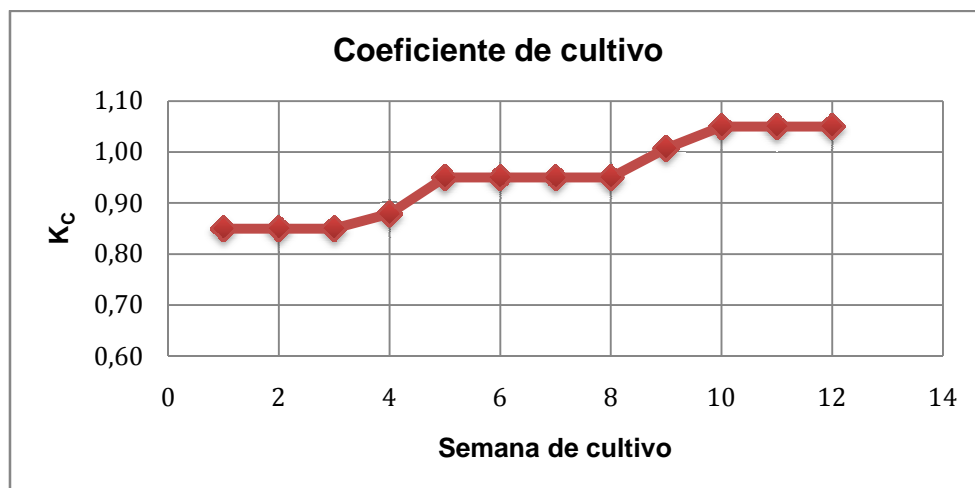


Figura 20. Coeficiente de cultivo (K_c) inicial y medio obtenidos en función de la ET_0 y la profundidad de infiltración.

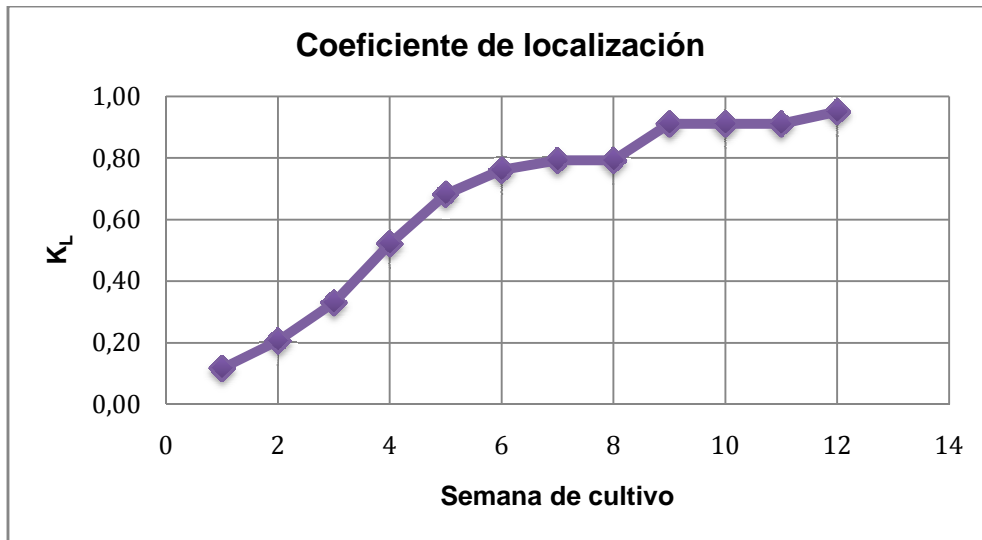


Figura 21. Coeficiente de localización (K_L) a partir del porcentaje de cobertura media a partir de la media de los resultados de las fórmulas propuestas por los autores Aljibury et al., Decroix, Hoare et al., Keller y Sharples et al.

Una vez obtenidos los valores medios semanales de la evapotranspiración del cultivo se procedió al cálculo de la dosis de riego. Esta dosis venía influenciada por los desplazamientos realizados a la Finca Tomás Ferro, por lo que se optó por aplicar un riego cada 3 días. De esta forma, la programación de los riegos queda tal y como se puede apreciar en la tabla 3.

ESTACIÓN	MUNICIPIO	PARAJE	FECHA	Dosis de riego (mm)	Dosis/maceta (L)	Dosis/maceta (m ³)
CA12	Cartagena	La Palma	1ª semana	0,20	0,02	2,31E-05
CA12	Cartagena	La Palma	2ª semana	0,29	0,03	3,35E-05
CA12	Cartagena	La Palma	3ª semana	0,57	0,06	6,45E-05
CA12	Cartagena	La Palma	4ª semana	0,73	0,08	8,35E-05
CA12	Cartagena	La Palma	5ª semana	1,28	0,15	1,46E-04
CA12	Cartagena	La Palma	6ª semana	1,24	0,14	1,42E-04
CA12	Cartagena	La Palma	7ª semana	1,43	0,16	1,63E-04
CA12	Cartagena	La Palma	8ª semana	1,62	0,18	1,84E-04
CA12	Cartagena	La Palma	9ª semana	1,86	0,21	2,13E-04
CA12	Cartagena	La Palma	10ª semana	2,17	0,25	2,48E-04
CA12	Cartagena	La Palma	11ª semana	2,97	0,34	3,38E-04
CA12	Cartagena	La Palma	12ª semana	3,84	0,44	4,38E-04

Tabla 12. Dosis de riego aplicada a cada maceta con un intervalo de 3 días con los volúmenes especificados para cada semana.

4.3. Sistema de muestreo circadiano en cámaras de cultivo

Tras las 12 semanas de crecimiento se trasladaron 12 plantas de cada línea a las dos cámaras de cultivo de que dispone el Área de Genética en el Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) perteneciente, de igual forma, a la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT).

Las cámaras de cultivo utilizadas fueron dos Sanyo MLR-350® (Panasonic, http://www.panasonic-biomedical.co.uk/ProdMLR-351_Plant_Growth_Chamber.htm). Se realizó una programación de las cámaras de cultivo tal que estuviesen sincronizadas el período nocturno y diurno coincidente con las horas de trabajo en el laboratorio.

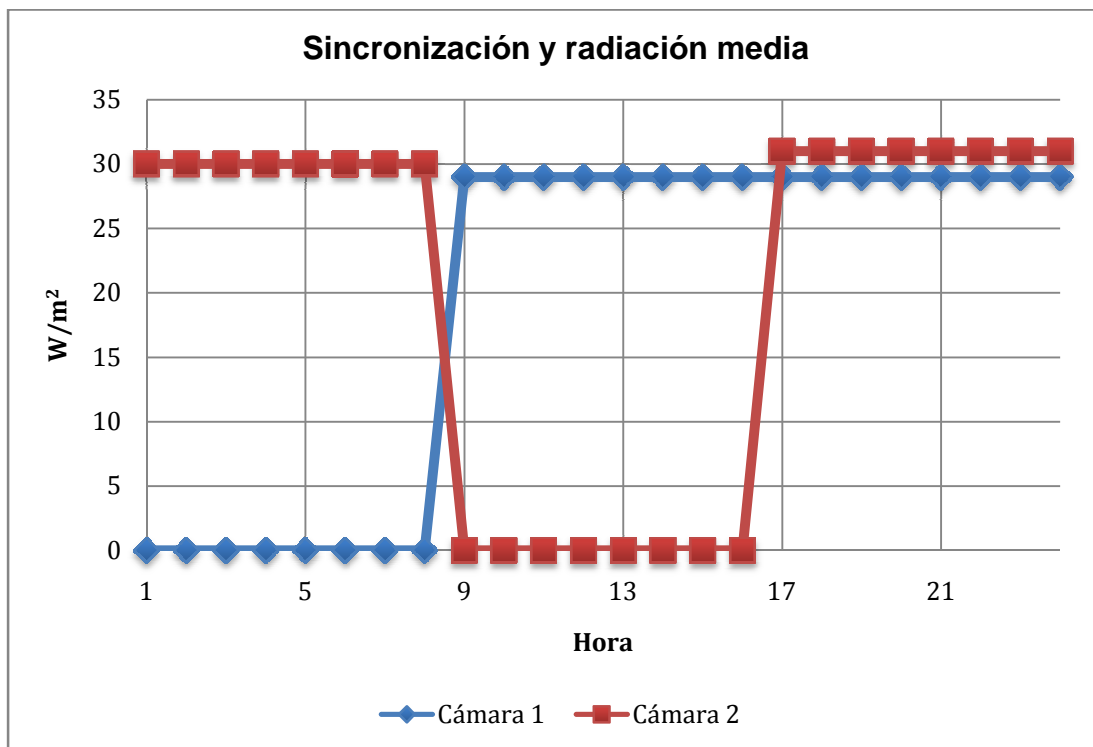


Figura 22. Programación diaria de las cámaras de cultivo durante el transcurso del establecimiento y acondicionamiento de las plantas. La radiación media durante el periodo diurno fue de 30 W/m².

Esta programación rotativa de las cámaras de cultivo nos permitió que durante la jornada de trabajo se recogiesen tanto muestras correspondientes al período diurno de la planta así como del nocturno. La programación, específica de días largos, tenía una duración ininterrumpida de 16 horas, 25°C de temperatura y 30 W/m² de radiación para

el período diurno y de 8 horas de duración y 16°C de temperatura para el período nocturno (figura 22).

Las 24 plantas de *A. majus* estuvieron una semana en dichas condiciones denominada fase de establecimiento y acondicionamiento. Esto es así debido a que los ritmos biológicos de las plantas deben adaptarse a las nuevas condiciones climáticas impuestas mediante las cámaras de cultivo. Tal es el caso que debemos esperar en torno a una semana para poder realizar la toma de muestras.

4.3.1. Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en cuatro intervalos de tiempo del día laboral tal que se correspondían, debido a la rotación de las cámaras de cultivo, con seis intervalos horarios del ciclo biológico real de las plantas (figura 23). Estos intervalos se correspondían con muestras tomadas a las 01.00, 05.00, 09.00, 13.00, 17.00 y 21.00 horas del período circadiano.

El material vegetal extraído se correspondía de hoja y pecíolo por cada planta a estudio. Se tomaron muestras de tres plantas de cada línea (mutante y silvestre) en los cuatro horarios de los que constaba la programación para la toma de pruebas, de tal forma que se obtuvieron muestras de todas y cada una de las plantas. Se precisó la toma de una única muestra por planta para que las reacciones bioquímicas posteriores a la escisión del material vegetal de cada una de las plantas no provocasen un efecto desestabilizador en las mismas y pudiese alterar el resultado de nuestros experimentos.

C1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C2	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Hora real									09.50				13.50				17.50				21.50			

Figura 23. Sincronización de las cámaras de cultivo. El color de fondo gris indica el periodo nocturno y el color amarillo el diurno. C1 se corresponde con la cámara de cultivo 1 y C2 con la cámara de cultivo 2. La hora real hace referencia a la hora del día en que se tomaron las muestras (elaboración propia).

4.4. Extracciones de DNA

Las extracciones de DNA genómico se realizó a partir de 100mg de material vegetal correspondiente con hojas y sus respectivos pecíolos hasta llegar al peso acordado. Se realizaron extracciones tanto de ejemplares del mutante *nana* como del silvestre. El kit de

extracción utilizado fue el NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, <http://www.mn-net.com/tabid/1365/default.aspx>). Las concentraciones finales de DNA genómico oscilaron entre 25 y 30 ng/μg para cada una de las muestras trabajadas. La concentración de gDNA se midió con un espectrofotómetro microvolumétrico NanoDrop 2000 (NanoDrop, <http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>). El volumen a aportar para cada medición fue de 1μL.

4.5. Extracciones de RNA

Las extracciones de RNA se realizaron con NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel, <http://www.mn-net.com/tabid/1327/default.aspx>) incluyendo un tratamiento DNasa. Una vez trituradas las muestras con nitrógeno líquido se pesaron y se procedió al cálculo de la cantidad correspondiente de reactivos del kit necesarios para la extracción en proporción a los 100mg especificados en el protocolo. Los pesos medios se encontraban entre los 100mg para las muestras recogidas de *Antirrhinum majus Nana* y 250mg para las extraídas de los individuos de *Antirrhinum majus Nana*.

4.6. Síntesis de cDNA

Para conocer qué genes y en qué cantidad se están expresando en las células vegetales (en nuestro caso) recurrimos al dogma central de la biología molecular que dicta lo siguiente: “durante la síntesis de proteínas, el DNA es transcrito en RNAm, que a su vez es traducido a proteínas”. Por tanto, para saber en cada instante como están trabajando las células y hacia dónde van encaminados sus esfuerzos recurrimos a extracciones de RNAm. Este RNAm como tal no nos sirve por lo que aplicando tecnologías del DNA recombinante logramos una transcripción inversa a DNA o lo que se conoce como cDNA mediante una transcriptasa inversa. El cDNA o ADN complementario se sintetiza a partir de una hebra simple de RNAm maduro y se trata de un DNA que va a ser nuestro producto final con el cual vamos a trabajar para realizar los experimentos que se describirán en epígrafes posteriores.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo con Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, <http://www.thermoscientificbio.com/reverse-transcription-rtqpcr-rtqpcr/maxima-first-strand-cdna-synthesis-kit/>). Un kit para la síntesis de la primera hebra de cDNA a partir de RNAm.

4.7. PCR a tiempo final

El término PCR, del inglés “Polymerase Chain Reaction” y, traducido al castellano, “reacción en cadena de la polimerasa” hace referencia a una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA. En teoría basta con partir de una copia de este fragmento original o molde (Saiki et al., 1988). Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de los DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de DNA vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente.

La herramienta con la que actualmente cuentan los investigadores para llevar a cabo esta serie de reacciones se denomina termociclador. Trabajamos con dos termocicladores:

- GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, <http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/brands/applied-biosystems.html>), cuya principal característica es la de que solamente se puede programar una temperatura de reacción, es decir, no se pueden usar cebadores con distintas temperaturas de alineamiento. De esta forma, el paso de una fase de la PCR a otra (paso de una temperatura determinada a otra) se realiza en el mismo bloque por lo que existe una rampa de temperatura entre una fase y la siguiente.
- Stratagene Robocycler® 96 PCR Thermal Cycler (Agilent Technologies, <http://www.genomics.agilent.com/en/PCR-RT-PCR/?pgid=AG-PG-10&navAction=pop>). Este termociclador usa 4 bloques separados de diferentes temperaturas (3 bloques calientes y uno frío) programables. Los tubos de PCR se mueven de un bloque a otro gracias a un brazo robótico, eliminando los tiempos que transcurren de una fase a otra (rampa de temperaturas) reduciendo el tiempo alrededor de un 30%. Además, tiene como ventaja con respecto al primer termociclador descrito que es programable para realizar un gradiente de temperaturas en el bloque destinado a la fase de alineamiento por lo que se puede trabajar con cebadores cuya temperatura de alineamiento sea diferente e incluso para realizar comprobaciones acerca de cuál es la mejor temperatura de alineamiento para uno o varios cebadores iguales.

4.8. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (qPCR o Q-PCR) o PCR en tiempo real (en inglés “real time PCR”; RT-qPCR o RT-Q-PCR) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de DNA. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de DNA, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs (desoxirribonucleótidos), un tampón de reacción adecuado, y una DNA polimerasa termoestable. A dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Watson et al., 2008). Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real (es decir, PCR inmediata, simultánea). En muchos casos el molde que se emplea para la PCR cuantitativa no es desde el principio DNA, sino que puede ser DNA complementario (cDNA), de hebra simple; en este caso, la técnica es una RT-PCR cuantitativa o en tiempo real, o RT-Q-PCR. Debe evitarse la confusión con la técnica denominada «PCR tras transcripción inversa» (RT-PCR, del inglés “reverse transcriptase PCR”), en la cual existe un paso de retrotranscripción de RNA a DNA pero que no necesariamente cuantifica el producto a tiempo real.

El equipo usado de PCR a tiempo real o cuantitativa en el laboratorio para este estudio fue el termociclador Stratagene® Mx3000P qPCR Systems (Agilent Technologies, <http://www.genomics.agilent.com/en/qPCR-Instruments-Software/Mx3005P-qPCR-System/?cid=AG-PT-169&tabId=AG-PR-1127>). Un termociclador a tiempo real que incluye un bloque de 96 pocillos para tubos de 0,2 ml con tapa en domo o bien, strips de 8 tubos o placas de 96 pocillos. Los equipos cuentan con una lámpara de luz blanca, como fuente de excitación y un sensible fotomultiplicador de 16 bits para la detección de emisión, logrando un rango dinámico de 10 unidades logarítmicas y capacidad de detección de una sola copia de DNA.

Los datos adquiridos son analizados por el software MXPro®, que cuenta con funciones de cuantificación absoluta y relativa según reglamento MIQE, pero además, incluye una función de discriminación alélica y SNPs por sondas diagnósticas y una función de lectura fluorométrica para cuantificar DNA o RNA total.

El software además cuenta con una función de experimentos múltiples, que le permite asociar distintas carreras dentro de un solo experimento.

4.9. Análisis de estructura y filogenia

La realización de ClustalX (alineamientos o apilamientos) y árboles filogenéticos para la comparación genética los llevamos a cabo con CLC Sequence Viewer® (CLC Bio, <http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer/>).

4.9.1. Realización de árboles filogenéticos

Un árbol filogenético entendido como tal es un tipo de gráfico que muestra las relaciones evolutivas entre varias especies u otras entidades (como en este caso se trata de secuencias de nucleótidos) que se cree tienen una ascendencia o común aunque también, para determinar si existe o no esa ascendencia.

El software CLC Sequence Viewer® nos provee de una herramienta capaz de lograr árboles filogenéticos utilizando varios métodos para la construcción y diferentes medidas de evaluación de los mismos.

El método utilizado en nuestras creaciones es el de Neighbor-joining que emplea técnicas generales de aglomeración de datos para el análisis de secuencias y se sirve de la distancia genética como un medidor de aglomeración. El método Neighbor-joining simple produce árboles no enraizados, pero no asume una tasa constante de evolución entre los linajes (Saitou & Nei, 1987).

Bootstrap es el método más utilizado para parsimonia y máxima verosimilitud a la hora de realizar árboles filogenéticos. Consiste en crear una matriz de datos cuyas columnas se van cambiando de forma aleatoria, e incluso se repiten en una misma matriz, y de cada una de las matrices resultantes crear un árbol filogenético, contando al final en cuántos de ellos aparece el clado a estudiar. Este proceso se repite varias veces, siendo lo más común repetirlo 1000 veces. Al final se indica el porcentaje de veces en que cada nodo del árbol se presentó en las matrices remuestreadas. Al final todos estos árboles se representan en un consenso donde aparecen los porcentajes de la proporción de cada réplica. Así, si una rama presenta más del 50% quiere decir que ésta es fiable.

4.10. Normalizado de datos de Q-PCR

Para la obtención de los Ct (del inglés “cycle threshold”, cuya traducción al castellano es “ciclo umbral”) usamos MxPro® QPCR software (Agilent Technologies, <http://www.genomics.agilent.com/en/qPCR-Instruments-Software/Mx3005P-qPCR-System/?cid=AG-PT-169&tabId=AG-PR-1127>). Una herramienta informática facilitada por el proveedor del equipo de PCR cuantitativa.

Emplear los valores de Ct como valor matemático permite obtener resultados fiables, pero este hecho puede no ser explotado directamente. A fin de conocer la cantidad de DNA inicial, es preciso pues realizar nuevas transformaciones matemáticas que requieren conocer la eficiencia de PCR, que suele determinarse gracias a una recta de calibrado. La eficiencia de amplificación de la PCR la conseguimos gracias al software estadístico R® y sus paquetes bioinformáticos (The R Project for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>).

La medida de la expresión génica por medio de Q-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno), en nuestro caso el gen *UBIQUITINE PROTEIN LIGASE (UBI)*. Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico, o normalizar respecto a la diferente concentración de RNA total de las muestras, ya que si la cantidad de control endógeno varía es debido a cambios en la cantidad de RNA total empleada en la síntesis de cDNA, no a cambios en su expresión. No existe ningún gen cuya expresión no varíe en ninguna de las condiciones, por lo que el usuario debe valorar cuál sería el mejor control endógeno para su experimento. Se recomienda testar varios genes para seleccionar el más adecuado. Nos surtimos del software bioinformático Qbase+® (Biogazelle, <http://www.biogazelle.com/qbaseplus>) para testar el mejor de los genes para el control endógeno (Mallona, Lischewski, Weiss, Hause, & Egea-Cortines, 2010) y para el posterior normalizado de datos relativos a la expresión génica en resultados posibles para su comparación absoluta (Hellemans, Mortier, De Paepe, Speleman, & Vandesompele, 2007; Vandesompele et al., 2002).

4.11. Análisis de datos de ritmo circadiano

Excel® (Microsoft, <http://www.microsoft.com/>) para la realización de gráficos relativos a la expresión circadiana de los genes estudiados.

Mystat® (Cranes Software International Ltd., <http://www.systat.com/>), versión académica del software Systat. Esta herramienta nos provee de soluciones estadísticas y gráficas para comprender de un simple vistazo cuales son las principales características de las funciones circadianas.

Para asignar la mejor función matemática trabajamos con el paquete informático XLfit® (ID Business Solutions, <http://www.excelcurvefitting.com/index.html>), un complemento para Excel® que nos permite, para un rango determinado de datos y sus réplicas, asignar la función matemática que mejor ajuste tenga. Para la determinación de una función matemática en el ámbito del estudio de los ritmos circadianos y, debido a las peculiaridades de éstos, trabajamos con funciones sinusoidales (ecuación 3).

$$y = M + A \sin\left(\frac{2\pi x}{\tau} + \varphi\right) \quad (3)$$

Siendo M , el valor de mesor; A , la amplitud de la curva; τ , el período y; φ , la fase.

De los Ct obtenidos de MxPro® y de las eficiencias obtenidas a partir del análisis de R® realizamos trabajos de comparación referente a las expresiones relativas de cada uno de los genes utilizando el software Rest® (Gene Quantification, <http://www.gene-quantification.de/rest.html>). Este software, denominado así por sus siglas en inglés "Relative Expression Software Tool" (en castellano, herramienta informática de expresión relativa), usa un modelo matemático basado en la eficiencia de amplificación de la PCR y la media de los Ct entre la muestra a estudio y la muestra control. Subsecuentemente, el ratio de expresiones de los transcritos a estudio son testados por significancia mediante el denominado Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test® y graficado con un error estándar (SE) estimado mediante un complejo algoritmo de Taylor (Pfaffl, Horgan, & Dempfle, 2002).

4.12. Desarrollo de cebadores para Q-PCR

El primer paso a realizar para el diseño de los cebadores consiste en la búsqueda de genes homólogos a al gen diana (gen de *Antirrhinum majus*) en especies cuyo genoma ya ha sido secuenciado o estudiado casi hasta la totalidad de su secuenciamiento mediante el estudio de numerosas bases de datos.

- *Antirrhinum majus* Genetic and Genomic Database (<http://www.Antirrhinum.net/>).

- The *Arabidopsis* Information Resource (<http://www.Arabidopsis.org/>).
- The European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>).
- National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Mediante la utilización de estas bases de datos utilizadas para el estudio, consulta y realización de ClustalX, Blast (Basic Local Alignment Search Tool) y traducciones de secuencias de nucleótidos a proteínas para su mejor comparación evitando así la degeneración del código genético, determinamos cuales eran nuestros genes diana y qué cebadores eran los mejores para nuestros experimentos teniendo en cuenta la existencia de intrones y de cómo de conservados se encuentran nuestros genes con respecto a sus homólogos en *Arabidopsis thaliana*, entre otras.

Los cebadores diseñados son de aproximadamente 25 nucleótidos, porque es la cantidad necesaria para que de manera probable se una a un sitio específico de la cadena de ADN (tabla 13).

Cebadores	Secuencias
AmTOC1-for	5' -AGGGCAGTTTCCGTAGTCAG-3'
AmTOC1-rev	5' -GCGCTTCATTTCCCATTAAG-3'
AmCAB-for	5' -CGATGGATCGTAAGTCCCTTT-3'
AmCAB-rev	5' -GCCTGCATTTCAAAATTCATTA-3'
AmCO-for	5' -CCAAAATTCGATAATCTAGGTCAGCAT-3'
AmCO-rev	5' -CTACCATTTCCCCACTGAAACACCTCC-3'
AmUBI-for	5' -CCGATGGAAGTATATGTTTG-3'
AmUBI-rev	5' -CAAGTCTTACAAGACCTAGAAGCTC-3'

Tabla 13. Cebadores utilizados en nuestros experimentos. La nomenclatura seguida es la siguiente: primero las siglas del material vegetal (*Am*, *Antirrhinum majus*) seguido del gen para el cual está diseñado el cebador y finalmente si se trata del cebador directo (-for, forward) o del cebador inverso (-rev, reverse).

Del buen diseño de los cebadores va a depender en gran medida el éxito y rapidez con la que se obtengan los resultados en cualquier investigación en materia de biología molecular.

4.12.1. Cebadores del gen *TIMING OF CAB 1 (TOC1)*

El gen *TIMING OF CAB 1 (TOC1)*, cuya accesión en *Antirrhinum majus* Genetic and Genomic Database es AJ809068, fue el primer gen para el cual diseñamos cebadores. Los cebadores con los que contamos (tabla 13) para este gen amplifican un tamaño de 234bp en cDNA (figuras 24 y 36) y 549bp para el DNA genómico (figura 25).

La diferencia de tamaños entre el amplicón de cDNA y el de gDNA se debe a la existencia de un intrón.

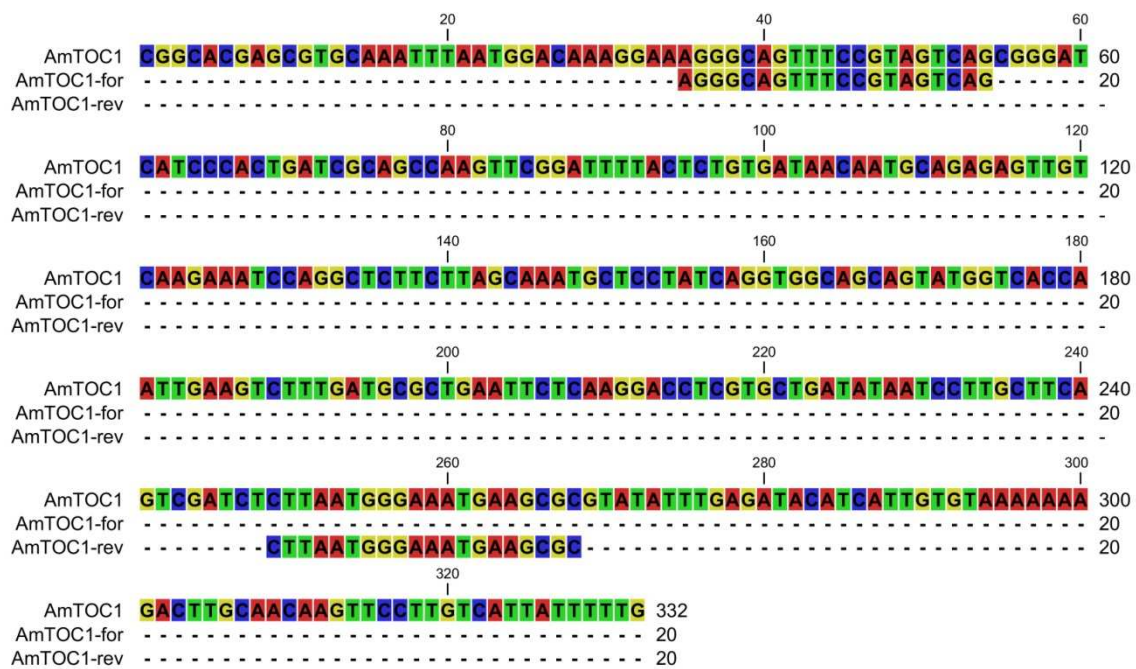


Figura 24. ClustalX de *AmTOC1* frente a sus cebadores *AmTOC1-for* y *AMTOC1-rev*.

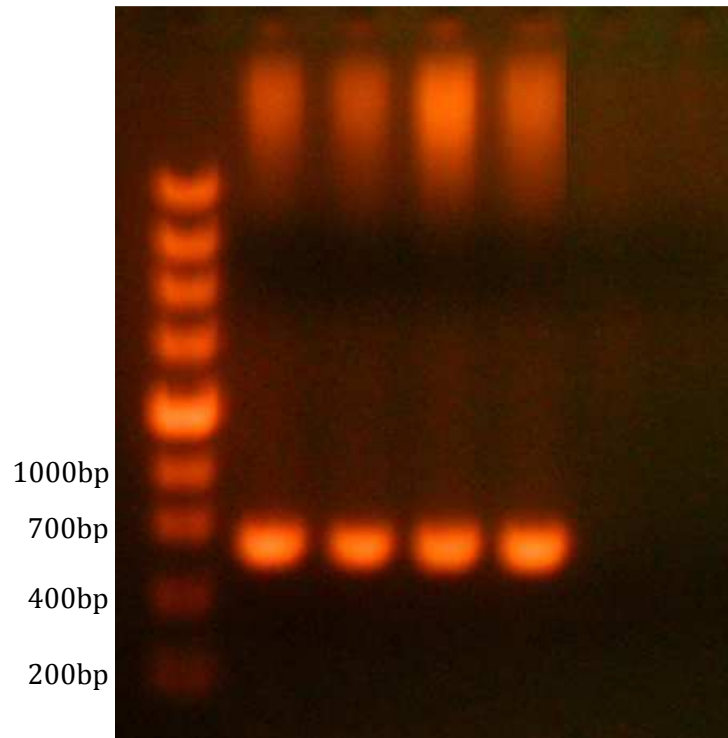


Figura 25. De izquierda a derecha: Ladder; *AmTOC1*; 1 gDNA Sippe50, 2 gD*Nana*, 3 gD*Nanana*, 4 gDNA 165E, 5 H₂O. Para cada una de las muestras: el primer número indica el orden en que se encuentra justo después del Ladder, el segundo número indica la hora del día circadiano de la muestra y por último la especificación de qué tipo de producto hablamos pudiendo ser cDNA, DNA genómico (gDNA) o RNA.

4.12.2. Cebadores del gen *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)*

Los cebadores diseñados para el gen *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)* amplifican un tamaño de 298bp en cDNA (figuras 26 y 27) y también 298bp en DNA genómico (figura 26). La accesión de *CAB* en *Antirrhinum majus* Genetic and Genomic Database es AJ802243.

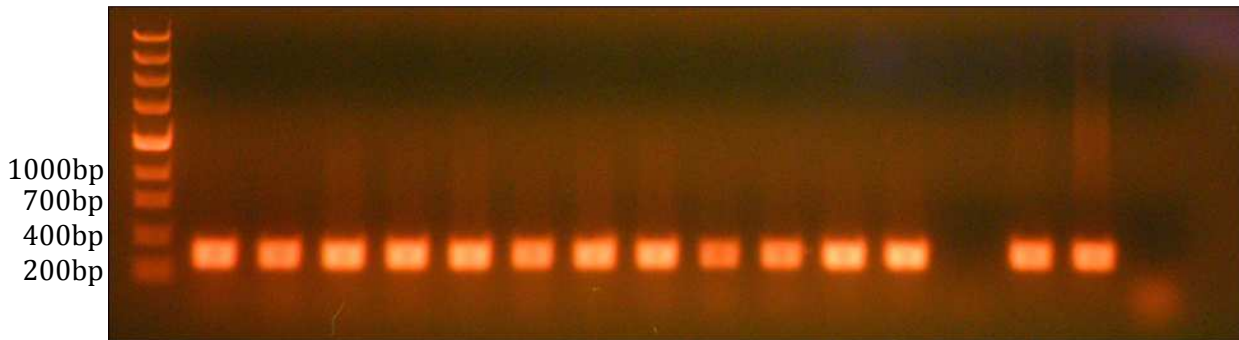


Figura 27. De izquierda a derecha: Ladder; *AmCAB*; 1 0900 cDNAwt, 2 0900 cD*Nana*, 3 1300 cDNAwt, 4 1300 cD*Nana*, 5 1700 cDNAwt, 6 1700 cD*Nana*, 7 2100 cDNAwt, 8 2100 cD*Nana*, 9 0100 cDNAwt, 10 0100 cD*Nana*, 11 0500 cDNAwt, 12 0500 cD*Nana*, 13 H₂O, 14 gDNAwt, 15 gD*Nana*, 16 RNA.

4.12.3. Cebadores del gen *CONSTANS (CO)*

Los cebadores diseñados para el gen *CONSTANS (CO)* amplifican un tamaño de 603bp en DNA genómico (figura 28) y también 603bp en cDNA (figura 29). La accesión de *CAB* en *Antirrhinum majus* Genetic and Genomic Database es AJ802160.

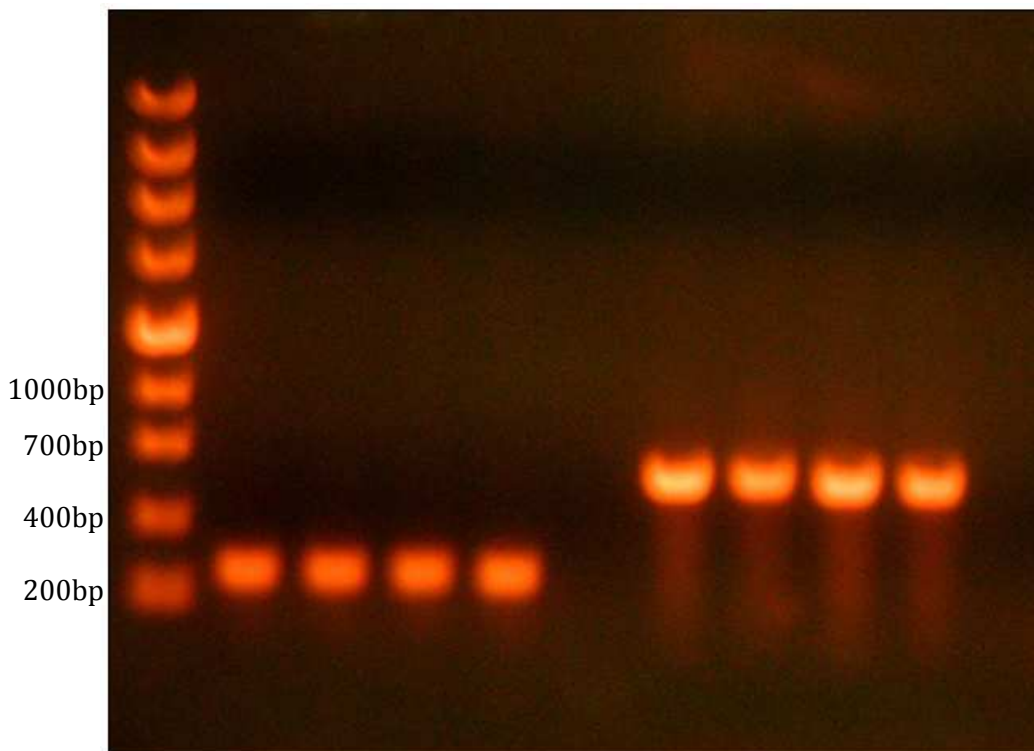


Figura 28. De izquierda a derecha: Ladder; *AmCDF (CICLING DOF FACTOR)*; *AmCO*; 1 gDNA Sippe50, 2 gD*Nana*, 3 gD*Nanana*, 4 gDNA 165E, 5 H₂O.

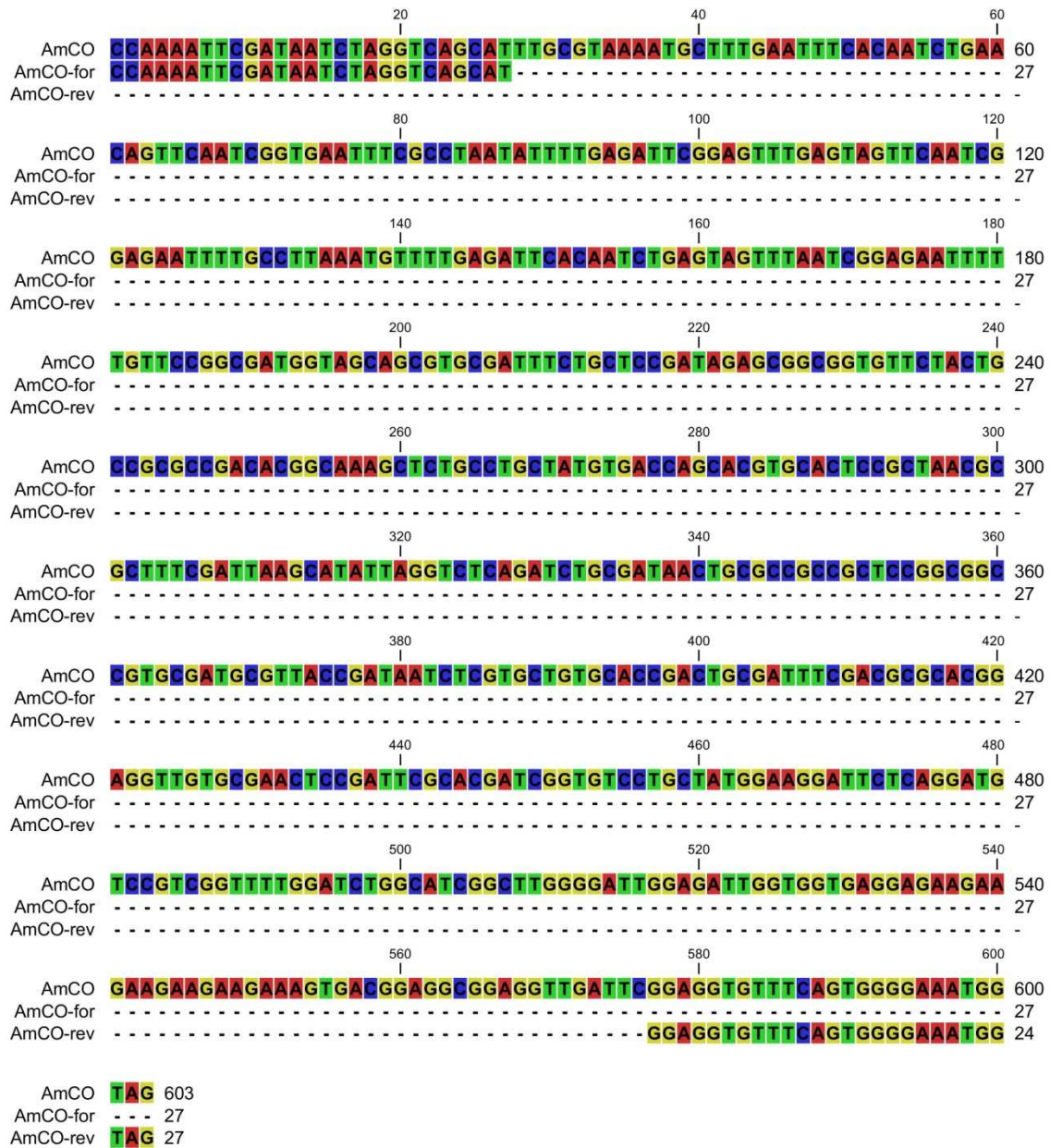


Figura 29. ClustalX de *AmCO* frente a sus cebadores *AmCO-for* y *AmCO-rev*.

4.12.4. Cebadores del gen *UBIQUITIN PROTEIN LIGASE (UBI)*

El gen *UBIQUITIN PROTEIN LIGASE (UBI)* se ha utilizado en este estudio como “housekeeping gene”, en castellano gen constitutivo. Se refiere a que es el gen que se expresa de manera constitutiva (o sea, que se expresa siempre) en todos los tejidos. Se trata de los genes encargados del metabolismo básico de la célula involucrados en el buen funcionamiento celular.

Los cebadores diseñados para *Ubiquitina* amplifican para un tamaño de 319bp tanto en cDNA como en DNA genómico (figura 30). La accesión de *CAB* en *Antirrhinum majus* Genetic and Genomic Database es AJ792039.

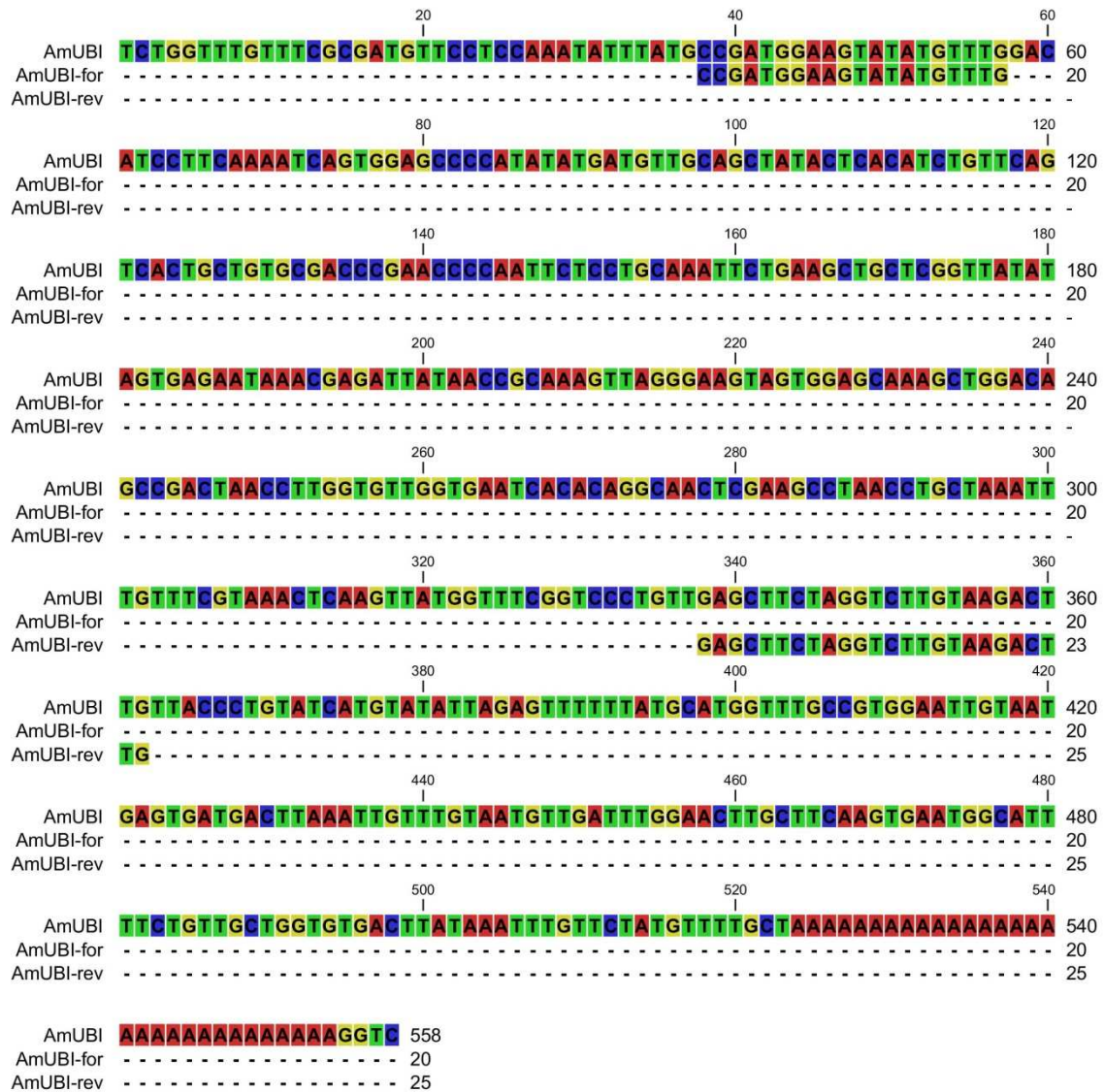


Figura 30. ClustalX de *AmUBI* frente a sus cebadores *AmUBI-for* y *AmUBI-rev*.

4.13. Optimizado y mejora del procedimiento de extracción de RNA

El proceso de extracción de ARN total se lleva a cabo con un kit que incluye el tratamiento con DNasa. Esto permite evitar la presencia de DNA genómico, ya que provocaría un amplificado directo de dianas en cualquier extracción. El análisis preliminar de la expresión de los genes utilizando cDNA tuvo como resultado un artefacto consecuencia de la contaminación de DNA genómico presente en el RNAm.

Se detectó el artefacto en la PCR a tiempo final que se realiza cada vez que se hace primera hebra de cDNA (figura 31). En esta figura podemos observar que la amplificación de cDNA coincide con la de DNA genómico. Esto no supondría ningún problema si el gen que queremos amplificar o incluso, la región del gen que queremos amplificar, no contase con uno o varios intrones ya que el tamaño del amplicón sería el mismo. Esto se pudo comprobar porque los cebadores para amplificar el gen *TOC1* estaban diseñados de tal forma que amplifican un intrón según la estructura del clon genómico de *Arabidopsis thaliana*. En las figuras 31 y 32 podemos comprobar que los amplicones correspondientes a *AmTOC1* mostraban dos tamaños diferentes.

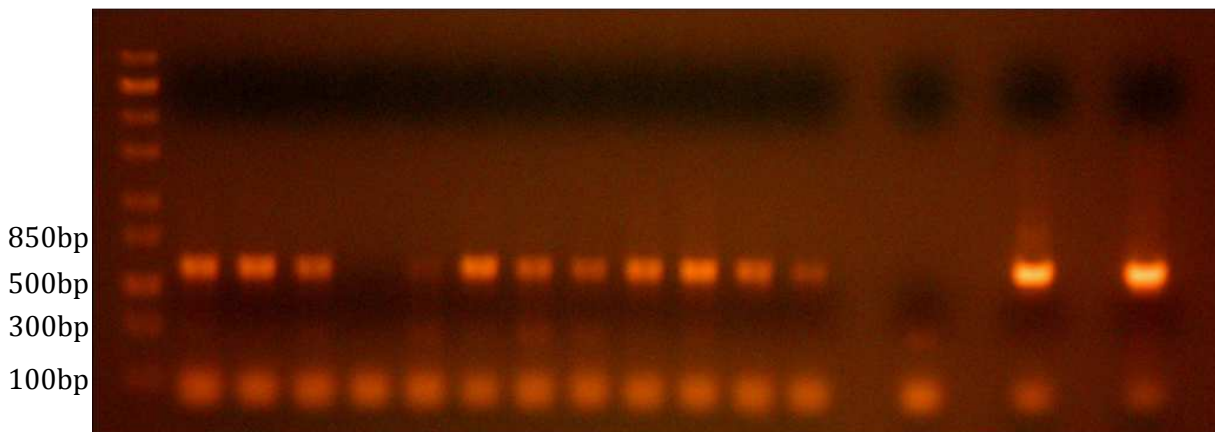


Figura 31. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900wt, 2 0900na, 3 1300wt, 4 1300na, 5 1700wt, 6 1700na, 7 2100wt, 8 2100na, 9 0100wt, 10 0100na, 11 0500wt, 12 0500na, 14 H₂O, 16 gDNAwt (silvestre), 18 gDNana.

Una vez detectado el artefacto procedimos a estudiar dónde se había producido. Para ello realizamos una PCR a tiempo final tanto con muestras de cDNA de las extracciones de RNA así como con RNA (figura 32). En una PCR a tiempo final en la que se utiliza RNA no debe aparecer ningún producto amplificado ya que la DNA polimerasa es específica del DNA y no del RNA. En nuestro caso pudimos observar que el artefacto detectado en el estudio previo provenía de las muestras de RNA.

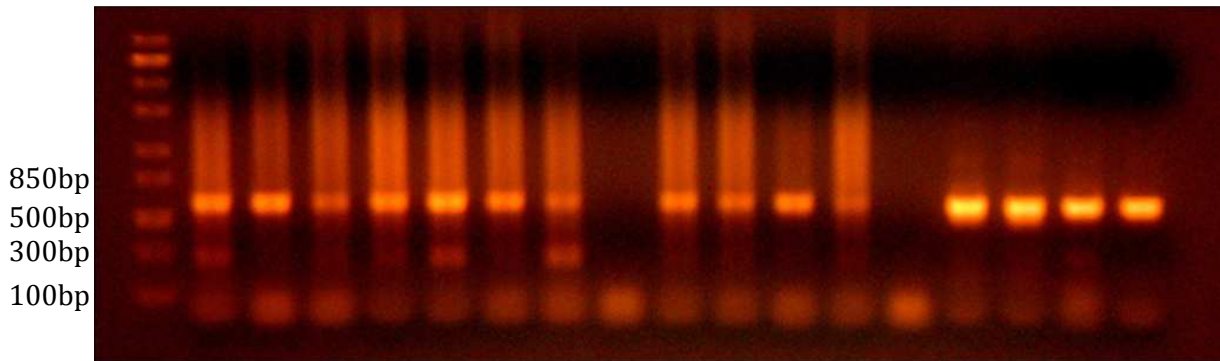


Figura 32. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900wt, 2 0900na, 3 1300wt, 4 1300na, 5 1700wt, 6 1700na, 7 2100wt, 8 2100na, 9 0100wt, 10 0100na, 11 0500wt, 12 0500na, 13 H₂O, 14 2100 gDNAwt, 15 0500 gDNana, 16 0900 RNAwt, 17 0900 RNana.

La prueba final para confirmar si el artefacto provenía o no del procedimiento de extracción de RNA se procedió a realizar una nueva PCR a tiempo final con varias de las muestras extraídas de RNA (figura 33).

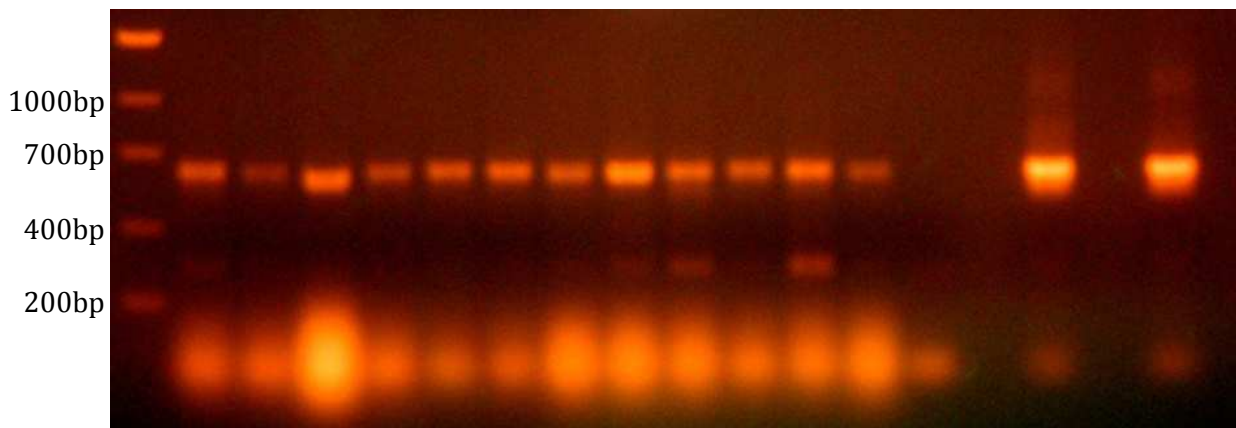


Figura 33. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900 RNAwt, 2 0900 RNana, 3 1300 RNAwt, 4 1300 RNana, 5 1700 RNAwt, 6 1700 RNana, 7 2100 RNAwt, 8 2100 RNana, 9 0100 RNAwt, 10 0100 RNana, 11 0500 RNAwt, 12 0500 RNana, 14 H₂O, 16 gDNAwt, 18 gDNana.

El tamaño esperado en la primera hebra de cDNA es de 234bp (pares de bases nitrogenadas) y para el gDNA es de 549bp (figuras 31, 32 y 33). Esto se debe que los cebadores diseñados para *TOC1* amplifican un intrón de *A. majus*. Como consecuencia de dichos resultados, llegamos a la conclusión de que la DNasa del kit que utilizamos se había desnaturizado debido a los continuos usos que ésta había tenido por el personal del

laboratorio. De hecho, modificamos el procedimiento de extracción de RNA incluyendo un tratamiento con DNasa externa.

4.13.1. Tratamiento DNasa

Se realizó un tratamiento con DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, <http://www.thermoscientificbio.com/dna-and-rna-modifying-enzymes/dnase-i-rnase-free/>). El tratamiento con DNasa se realizó tal y como se describía en el protocolo del fabricante y se introdujo en el protocolo de extracción de RNA que se usaría para posteriores trabajos.

Una vez realizado el tratamiento enzimático se midieron las concentraciones de las muestras digeridas en NanoDrop resultando una media de 75ng/μL de RNA. De acuerdo con estos resultados de espectrofotometría se realizó una PCR a tiempo final con el producto de la reacción descrita anteriormente (figura 34).



Figura 34. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900 RNAwt, 2 0900 RNana, 3 1300 RNAwt, 4 1300 RNana, 5 1700 RNAwt, 6 1700 RNana, 7 2100 RNAwt, 8 2100 RNana, 9 0100 RNAwt, 10 0100 RNana, 11 0500 RNAwt, 12 0500 RNana, 13 H₂O, 14 gDNA

En la figura 34 se puede observar que el RNA está totalmente limpio y sólo es el gDNA el que amplifica para el tamaño de amplicón anteriormente especificado (549bp).

4.13.2. Primera hebra de cDNA

Una vez descontaminado el RNAm con el que se iba a trabajar y una vez realizada la primera hebra de cDNA se realizó una PCR a tiempo final para comprobar que la

reacción había transcurrido satisfactoriamente. Una vez realizada la electroforesis con los productos de la PCR a tiempo final deducimos que había un exceso de EDTA tras la reacción DNasa del RNA, lo que había provocado una quelatación del magnesio que se usa en los protocolos de PCRs. Se modificó el protocolo de las PCRs en el que aumentamos la concentración de cloruro de magnesio. Obtuvimos el mismo resultado (figura 35).

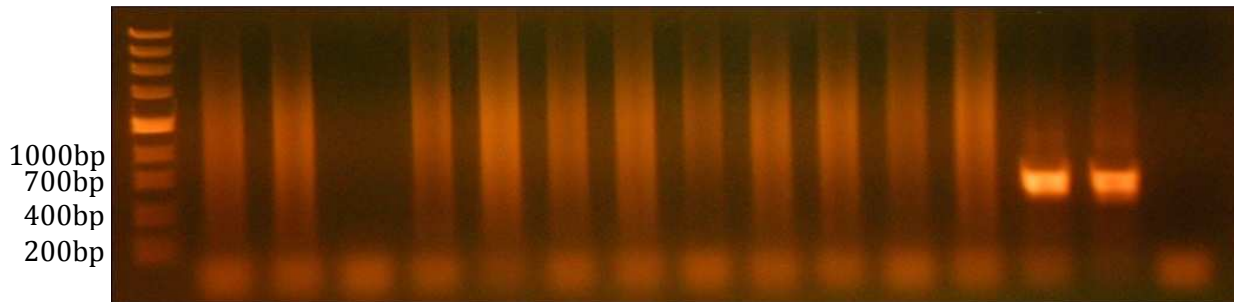


Figura 35. De izquierda a derecha: Ladder; TOC1; 1 0900 cDNAwt, 2 0900 cDNana, 3 1300 cDNAwt, 4 1300 cDNana, 5 1700 cDNAwt, 6 1700 cDNana, 7 2100 cDNAwt, 8 2100 cDNana, 9 0100 cDNAwt, 10 0100 cDNana, 11 0500 cDNAwt, 12 0500 cDNana, 13 gDNAwt, 14 gDNana, 15 H₂O.

En la figura 35 podemos observar que los tamaños de *AmTOC1* se ven claramente difusos por lo que decidimos precipitar el RNA y realizar una purificación con fenol-cloroformo (descripción del protocolo en el epígrafe 4.12.3.).

4.13.3. Fin de la contaminación

Una vez realizada la digestión, precipitación y purificación del RNA procedimos nuevamente a la realización de la primera hebra de cDNA y a su posterior PCR. Tras estos pasos obtuvimos unas muestras limpias y descontaminadas.

En la figura 36 podemos observar que efectivamente los tamaños de *AmTOC1* se corresponden con los esperados a partir de la secuencia de cDNA. Se observan también en dicha figura una serie de manchas borrosas en la parte inferior de la electroforesis que se corresponden a la formación de dímeros, ya que la temperatura de fusión de ambos cebadores y la temperatura de alineamiento es próxima entre ellos.

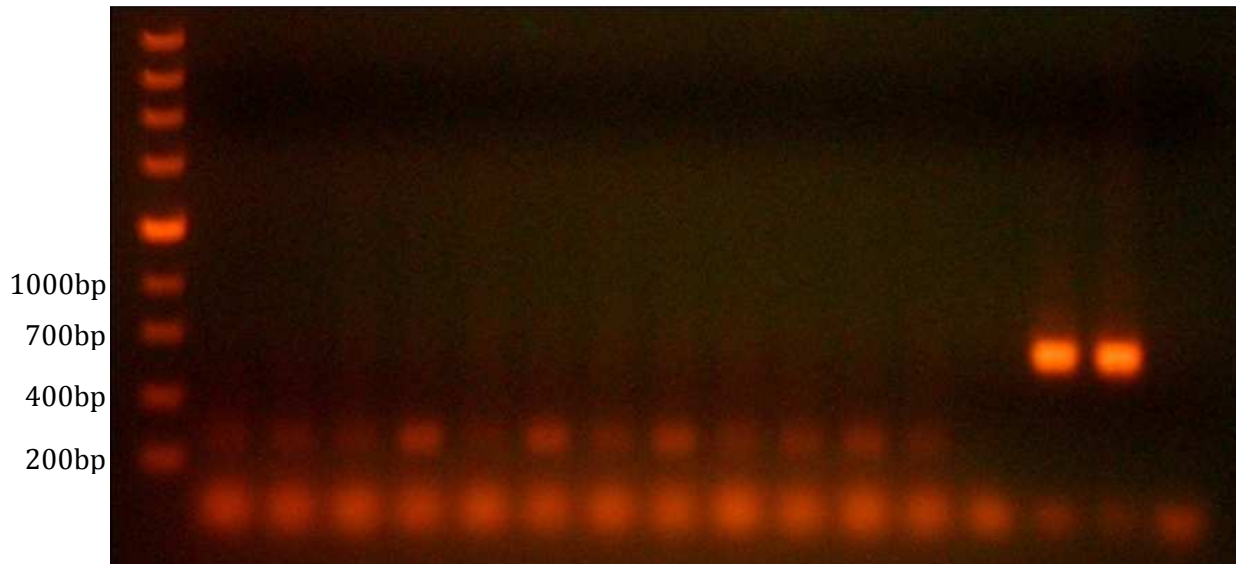


Figura 36. De derecha a izquierda: Ladder; *AmTOC1*; 1 0900 cDNAwt, 2 0900 cDNana, 3 1300 cDNAwt, 4 1300 cDNana, 5 1700 cDNAwt, 6 1700 cDNana, 7 2100 cDNAwt, 8 2100 cDNana, 9 0100 cDNAwt, 10 0100 cDNana, 11 0500 cDNAwt, 12 0500 cDNana, 13 H₂O, 14 gDNAwt, 15 gDNana, 16 RNA.

4.13.4. Digestión, precipitación y purificación de RNA

4.13.4.1. Reactivos

Para llevar a cabo el protocolo de digestión, precipitación y purificación del RNA necesitamos tener preparados antes de empezar los siguientes reactivos:

- Acetato de sodio 3M (3 molar)
- Agua con DEPC (dietilpirocarbonato)
- Cloroformo
- Etanol al 70% y al 100%
- Fenol

El agua con DEPC debe usarse a la hora de lavar el material que va a estar en contacto con el RNA así como en la preparación de los reactivos que intervienen en el protocolo. El dietilpirocarbonato tiene un efecto anti-RNasa y su método de preparación es el que acontece:

1. Autoclavar 1L de agua destilada.
2. Poner 1mL en 1L del agua autoclavada.

3. Poner en fuerte agitación durante al menos 12 horas ya que es muy tóxico y de esta forma se inactiva su potencial peligroso para el ser humano.
4. Autoclavar dos veces.

4.13.4.2. Protocolo de digestión, precipitación y purificación de RNA

1. Partiendo de 90µL de RNA se procede a la digestión del mismo con DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, <http://www.thermoscientificbio.com/dna-and-rna-modifying-enzymes/dnase-i-rnase-free/>).
2. Después de la desnaturalización de la DNasa (último paso del kit DNasa I, RNasa-free) tenemos en cada eppendorf 110µL. Añadimos 12µL de acetato de sodio 3M.
3. Añadir 250µL de etanol al 100% y dar un vortex.
4. Centrifugar durante 45 minutos a 11.000 rpm (revoluciones por minuto).
5. Quitar el sobrenadante con una pipeta pasteur y coleccionar el pellet.
6. Añadir 100µL de etanol al 70%, centrifugar durante 10 minutos a 11.000rpm y volver a coleccionar el pellet.
7. Añadir 200µL de agua con DEPC (dietilpirocarbonato).
8. Añadir 100µL de fenol y 100µL de cloroformo a cada una de las muestras.
9. Agitar vigorosamente con un vortex durante 1 minuto aproximadamente.
10. Centrifugar durante 5 minutos a 11.000rpm y extraer la fase superior en un nuevo eppendorf.
11. A este nuevo eppendorf añadimos 20µL de acetato de sodio 3M y 500µL de etanol al 100% y centrifugamos durante 45 minutos a 11.000rpm.
12. Extraer el sobrenadante y coleccionar el pellet.
13. Añadir 100µL de etanol al 70% y centrifugar durante 10 minutos y 11.000rpm.
14. Retirar el sobrenadante y coleccionar el pellet.
15. Resuspender en 100µL de agua con DEPC.

5. Resultados

Los resultados del análisis de micromatrices de *nana* mostraron genes con expresiones contrastantes con funciones diversas. Pero todos tenían en común el ser genes involucrados en el reloj circadiano o ser genes aguas debajo de dicho sistema de control. Por tanto, con el objeto de verificar si *nana* era efectivamente un gen involucrado en el control del ritmo circadiano, llevamos a cabo un estudio de tres genes diferentes. El gen *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)*, fue identificado como un gen cuya expresión es circadiana (Piechulla, Kellmann, Pichersky, Schwartz, & Forster, 1991) y se ha utilizado como marcador en estudios de mutantes relacionados con el reloj. El gen *AmCAB* (AJ802243) apareció como un gen reprimido unas 10 veces sobre los niveles de silvestre. Otro gen expresión diferencial fue *CONSTANS (CO)*, que es un factor de transcripción tipo B-BOX que actúa aguas abajo del reloj activando floración (Samach et al., 2000). El gen *AmCO* (AJ802160) se encuentra sobreexpresado unas 4 en *nana* lo que podría explicar su floración temprana independiente de fotoperiodo (Tabla 8). El tercer gen en cuestión fue *AmTOC1* (AJ809068), *TIMING OF CAB 1 (TOC1)*, pues tanto si na fuese alélico como si estuviese afectado en otro de los genes del reloj, deberíamos de encontrar efectos sobre su expresión (Alabadi et al., 2001; Huang, Perez-Garcia, et al., 2012).

5.1. Estudio del gen de referencia *UBIQUITIN PROTEIN LIGASE (UBI)*

La ubiquitina (o ubicuitina) es una pequeña proteína reguladora que ha sido encontrada en la mayoría de los tejidos de los organismos eucariotas. Su función es dirigir el reciclaje de proteínas, pudiendo asociarse a proteínas y marcarlas para su destrucción (Hershko & Ciechanover, 1998).

Los genes que codifican ubiquitina han sido catalogados como genes constitutivos, es decir, que se trata de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales para su funcionamiento general (tal y como se especificó en anteriores epígrafes). Es por esto que hemos escogido este gen como referencia de nuestros estudios.

Además, para cerciorarnos de que el gen *UBI* se expresa de manera constitutiva y en la misma concentración realizamos un estudio con Qbase+® (datos no mostrados). Este análisis arrojó los resultados esperados en los que los niveles de expresión del gen *AmUBI* (AJ792688) se encontraron constantes para cualquier hora del día.

5.2. Estudio del gen *TIMING OF CAB 1 (TOC1)*

El gen *TIMING OF CAB 1 (TOC1)*, pertenece a una familia pequeña de genes del tipo *PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR)*, que en *Arabidopsis* tiene cinco miembros, *PRR1 (TOC1)*, *PRR3*, *PRR5*, *PRR7* y *PRR9*. Todos ellos forman parte del reloj circadiano (Alabadi et al., 2001). El gen *TOC1* es el responsable del comienzo del bucle de la noche y parece actuar como un represor de transcripción de otros genes del reloj, así como de genes estructurales blanco del reloj (Huang, Perez-Garcia, et al., 2012), así como de genes estructurales blanco del reloj. Es el caso de *CAB*, de ahí su nombre. El gen *TOC1* es un elemento central del oscilador (Somers, Webb, Pearson, & Kay, 1998).

5.2.1. Estructura y filogenia del gen *AmTOC1*

En este apartado presentamos los resultados obtenidos a partir del estudio de la estructura y filogenia del gen *TOC1* para *Antirrhinum majus* en comparación con diversos genes ortólogos que componen la familia de *TIMING OF CAB 1* en plantas (figuras 37 y 38). La realización de ClustalX con secuencias proteicas reside en conseguir apilamientos más homogéneos, en el caso de que sea posible. Como todos sabemos, el código genético está degenerado por lo que varias triadas de nucleótidos podrían dar como producto un mismo aminoácido. Por este motivo, y para eliminar diferencias evolutivas de genes con productos similares (entiéndase proteínas), trabajamos con apilamientos de secuencias proteicas con ClustalX.

En el estudio de nuestro gen diana frente a su ortólogo en *Arabidopsis thaliana* *TOC1* y el resto de parálogos que conforman la familia *PRR* hemos encontrado parecidos estructurales significativos (figura 37). Dichos parálogos pertenecen a una familia de genes denominados *PSEUDO RESPONSE REGULATOR* y fueron descritos como integrantes del reloj circadiano de *A. thaliana* (Nakamichi et al., 2009; Takata et al., 2010). Así, *AtTOC1*, *AtPRR3*, *AtPRR5*, *AtPRR7* y *AtPRR9* son parálogos entre sí y ortólogos, a su vez, de *AmTOC1*.

Ciñéndonos al apilamiento, se puede observar que la homología entre las proteínas tanto de *Antirrhinum* como de *Arabidopsis* es alta debido al grado de conservación de las

secuencias de aminoácidos transcritos. De la misma forma, podemos notar que la proteína codificada por el EST que tenemos parece estar completa en la zona 5' al coincidir la metionina con la de AtTOC1. Por otro lado, carecemos de la zona 3', lo que indica la necesidad de clonar dicho fragmento por RACE o llevando a cabo un experimento de transcriptómica de Next-Generation Sequencing que permita desarrollar herramientas exhaustivas de trabajo.

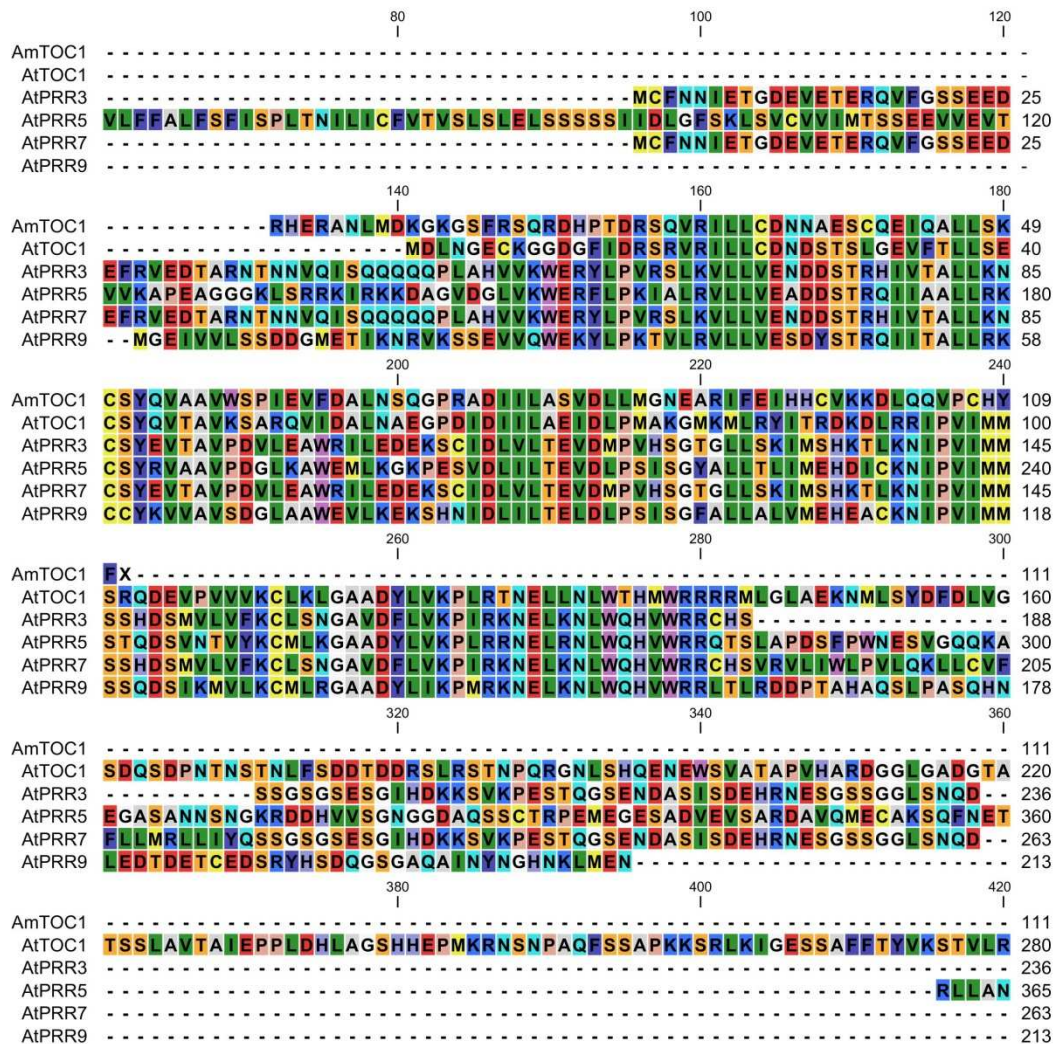


Figura 37. ClustalX de TIMING OF CAB1. Am, *Antirrhinum majus* y; At, *Arabidopsis thaliana*. PRR3, PRR5, PRR7 y PRR9 forman, junto con TOC1, el grupo multigénico PRR en el genoma de *Arabidopsis*.

Como apilamiento alternativo, hemos escogido una serie de proteínas cuyas secuencias presentan una mayor homología con *AmTOC1* que las mostradas anteriormente por los de *Arabidopsis* (figura 38). En este nuevo apilamiento podemos

observar que efectivamente la metionina conservada en todos los ORFs se encuentra presente en nuestro clon. Sin embargo, corroboramos el alto grado de homología que existe entre los diversos parálogos para los cuales se les grafica el producto proteico. Esto nos hace concluir que efectivamente el clon manejado es el correspondiente a *AmTOC1*.

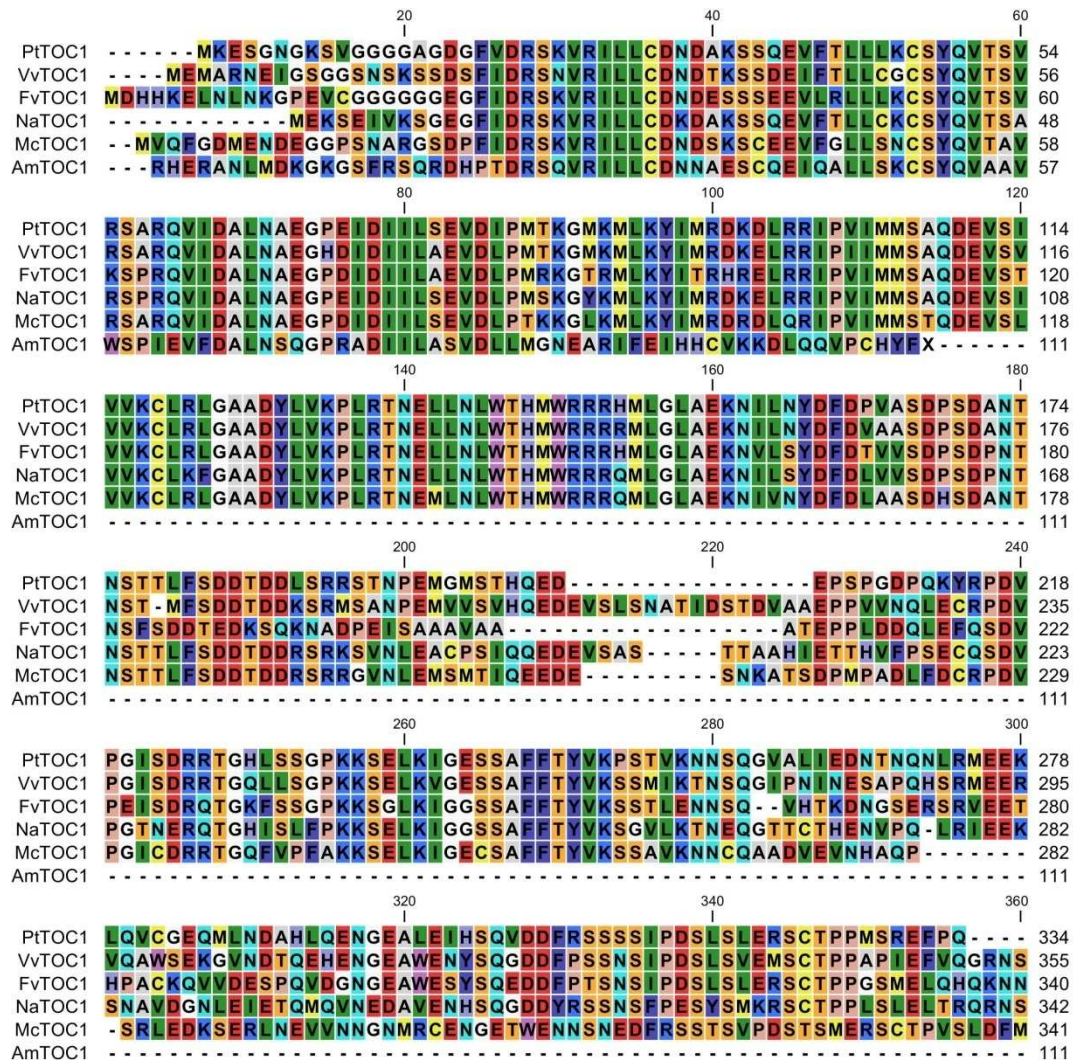


Figura 38. ClustalX de diversas ortólogas a TIMING OF CAB1. Pt, *Populus trichocarpa*; Vv, *Vitis vinífera*; Fv, *Fragaria vesca*; Na, *Nicotiana attenuata*; Mc, *Mesembryanthemum crystallinum* y; Am, *Antirrhinum majus*.

Para conocer el grado de divergencia entre *AmTOC1* y sus diversos parálogos optamos por realizar un estudio filogenético mediante la inclusión de diversos genes TOC1 en un árbol filogenético (figura 39). En dicho árbol podemos observar clados muy diferenciados correspondientes a genes cuya secuencia se encuentra en un grado de conservación muy parecido. No obstante, fijándonos en *Antirrhinum* vemos como en su

mismo clado se encuentra *Jatropha curcas*, especie cuyo gen parálogo para CAB se situaba en el mismo clado filogenético que *AmCAB*. Fuera del mismo clado, nuevos parálogos como *Thlaspi arvense* (carraspique, *Brassicaceae*) o *Chrysanthemum seticuspe* (crisantemo, *Asteraceae*) y, a mayor distancia *Solanum lycopersicum* (tomate, *Solanaceae*) o *Nicotiana attenuata* (tabaco silvestre, *Solanaceae*) presentan también altos grados de homología, reforzando la hipótesis de que nuestro gen es ortólogo del clado correspondiente a *TOC1* de esta familia multigénica.

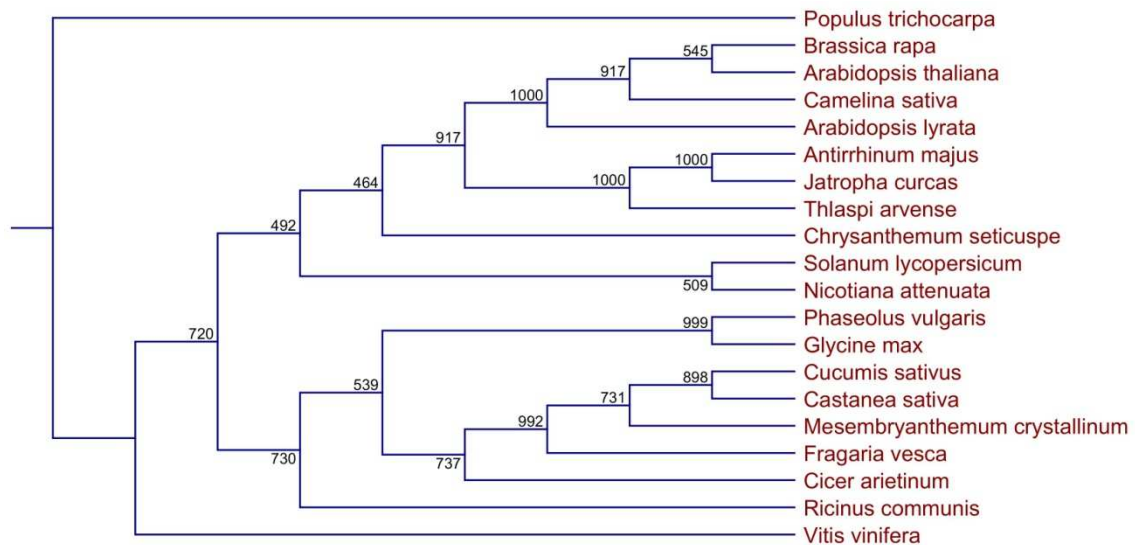


Figura 39. Árbol filogenético del gen *TIMING OF CAB 1*. El árbol filogenético se ha llevado a cabo con CLC Sequence Viewer® utilizando el método Neighbor-joining. En los nodos aparecen los valores de Bootstrap (valores calculados a partir de 1.000 repeticiones).

5.2.2. Control de *AmTOC1* en el reloj circadiano

Se ha asociado a *TIMING OF CAB 1* en *Arabidopsis thaliana* como un gen clave en el modelo del oscilador y numerosos son los estudios que se han llevado a cabo sobre su función e implicación el reloj circadiano. Con el estudio que se presenta a continuación tratamos de dar a conocer el comportamiento de *TOC1* en *Antirrhinum majus* para dos genotipos diferentes, el silvestre y el mutante *nana*.

Para la determinación y asignación de un ciclo circadiano al gen *AmTOC1* estudiamos el grado de expresión en la planta para diferentes horas del día. Una vez realizadas las extracciones de RNAm y su posterior transcripción inversa para trabajar con secuencias de DNA procedimos a realizar una PCR cuantitativa que nos proporcionaría los

datos necesarios para estimar, en condiciones de laboratorio, cuál sería su comportamiento.

Una vez recolectados los datos del software MxPro® y traducidos a valores de “Eficiencia de amplificación” y “Ct” por parte del software R® bifurcamos nuestro estudio para obtener más enfoques del mismo resultado. La primera vía que escogemos es la de normalizar los datos obtenidos de R® con el software Qbase+® (Vandesompele et al., 2002) para su posterior análisis con XLfit®, un paquete informático para Excel® especialmente diseñado para el ajuste de curvas a series de datos. La segunda vía de estudio consiste en trabajar los datos obtenidos a partir de R® con el software Rest®, una herramienta informática para el análisis estadístico sobre la expresión relativa de la concentración de nuestro gen diana para una determinada hora del día con respecto a la expresión del mismo gen a una hora diferente del día (Pfaffl et al., 2002). Con este software hemos determinado si uno o varios puntos del ciclo circadiano son significativamente diferentes tanto por sobreexpresión como por infraexpresión con respecto a los demás valores que componen la función circadiana.

5.2.2.1. *AmTOC1, genotipo silvestre*

Siguiendo las pautas establecidas en el anterior estudio del gen *AmCAB* hemos llevado a cabo la representación gráfica de los datos referentes a concentraciones de RNAm de *AmTOC1* normalizados frente al gen de referencia *AmUBI*. Los datos han sido normalizados utilizando scripts estadísticos de R® y herramientas matemáticas de Qbase+® para luego ser graficados con Excel® y XLfit® (figura 40).

Observando los datos representados en la figura 40 apreciamos que el comportamiento de *AmTOC1* sigue un patrón determinado para diferentes réplicas biológicas. De esta forma, tenemos máximos de expresión durante el período nocturno (0 a 8 horas en las que llega a ser de 30 veces la expresión de *AmUBI*) y una caída bastante pronunciada en cuanto sale el sol (valores medios en torno a -10 veces la expresión normal de *AmUBI*), lo que nos da una primera idea acerca de la contundencia con que el reloj sobreexpresa o reprime sus productos génicos. A finales del día vemos unos pequeños picos de expresión que podrían corroborar la hipótesis de que *TOC1* forme parte del reloj central también de *Antirrhinum*, hecho que discutiremos más adelante. Cabe destacar la gran oscilación en lo referente a la concentración de RNAm de *AmTOC1* durante las diferentes horas del día.

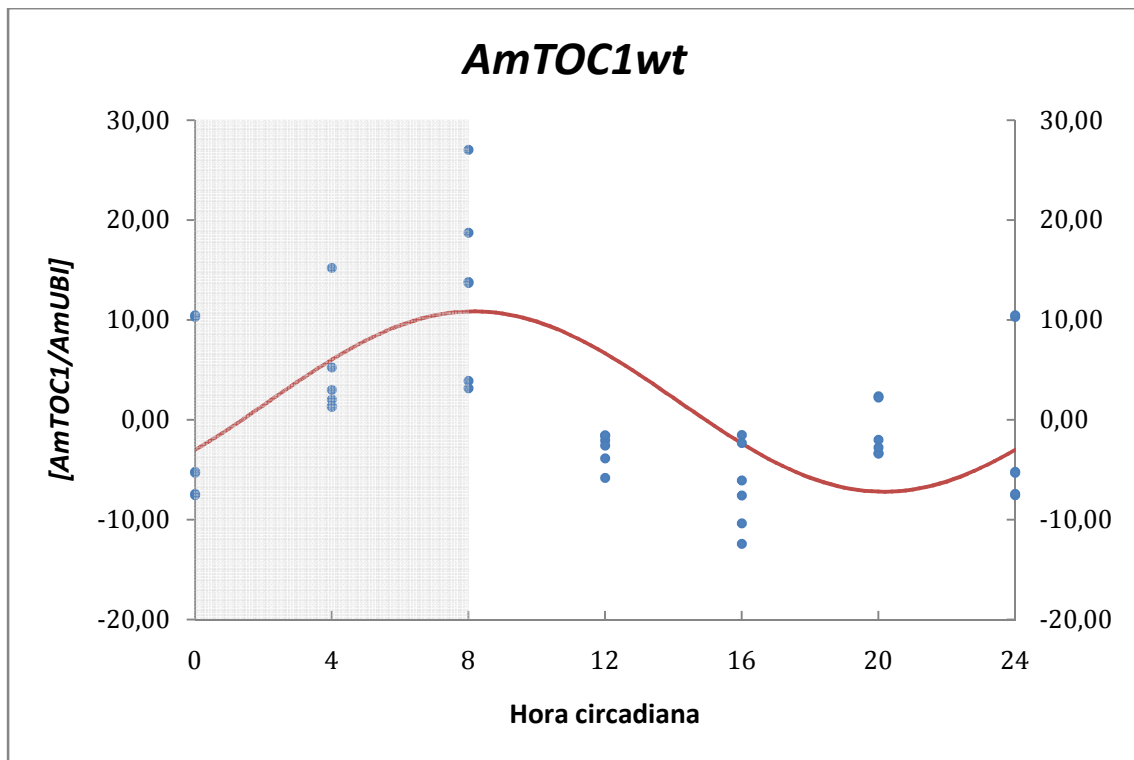


Figura 40. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *TIMING OF CAB 1* (*TOC1*) para el genotipo silvestre *Antirrhinum majus Nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja).

En el análisis realizado con XLfit® hemos obtenido la función más representativa del gen *AmTOC1* en silvestre. La bondad r^2 del ajuste de la función con respecto a los datos obtenidos es de 0.50. Un valor de mesor de 1.82, una amplitud A de 9.03, un período τ estimado de 24 horas y, una fase φ de -0.57 horas definen los parámetros de la función (ecuación 4, figura 40).

$$y = 1.82 + 9.03 \sin(0.26x - 0.57) \quad (4)$$

Observando la función modelo propuesta para describir el funcionamiento circadiano de *AmTOC1* debemos hacer especial hincapié en la gran amplitud de oscilación con respecto a *AmUBI* (± 9.03 veces, o lo que es lo mismo, una sobre e infraexpresión del

903%). La transcripción del gen comienza por la tarde-noche para dar su máxima concentración de expresión al final del período nocturno (o primera hora de la mañana).

Del análisis llevado a cabo mediante el software Rest® hemos obtenido unos resultados que requieren nuestra atención apreciar. La sobreexpresión que apreciamos (figura 40) a las 8 horas ha sido calificada como diferencia significativa (valor $p < 0.05$) mediante el análisis estadístico realizado en todas sus variantes, es decir, comparando contra cualquier punto de la curva. Por otra parte, los valores correspondientes con las 12 y 16 horas arrojaron diferencias significativas en relación a la infraexpresión que muestran frente a los demás valores que tenemos para diferentes horas.

Los resultados obtenidos por las diferentes metodologías escogidas para el análisis de los datos referentes a la expresión de RNAm de *AmTOC1* en silvestre nos han proporcionado un único enfoque para describir el comportamiento de este gen y su implicación en el reloj circadiano. Dichas metodologías, fundamentadas en el análisis bioinformático, han corroborado las primeras incertidumbres que teníamos sobre el comportamiento circadiano de este gen en *Antirrhinum majus* y, a su vez, hemos logrado que sean coherentes entre sí diversos enfoques de manejar los datos obtenidos.

5.2.2.2. *AmTOC1*, genotipo mutante

El análisis de la expresión de *AmTOC1* y su implicación en el reloj circadiano de *Antirrhinum majus Nana* nos lleva al principal objetivo de nuestro proyecto, determinar si el mutante *nana* está realmente afectado en el reloj circadiano. Para ello hemos graficado, nuevamente, los datos obtenidos a partir de las herramientas informáticas ya citadas referentes a la expresión de *AmTOC1* en *na* a lo largo de un período de 24 horas (figura 41). En este caso, podemos observar como el comportamiento de *TOC1* no se asemeja, en principio, a ningún patrón circadiano establecido.

En la figura 41 apreciamos que existen réplicas biológicas cuyos máximos y mínimos de expresión coinciden en las mismas horas del día creando una nube de puntos difusa y difícil de observar en ella algún patrón de ritmicidad. El rango de datos nos lleva a tener sobreexpresiones del 600% e infraexpresiones del -900%, incluso, en determinados puntos del día como las 16 horas tenemos puntos situados con una sobreexpresión de 5 veces y una infraexpresión de 9 veces con respecto a *AmUBI*.

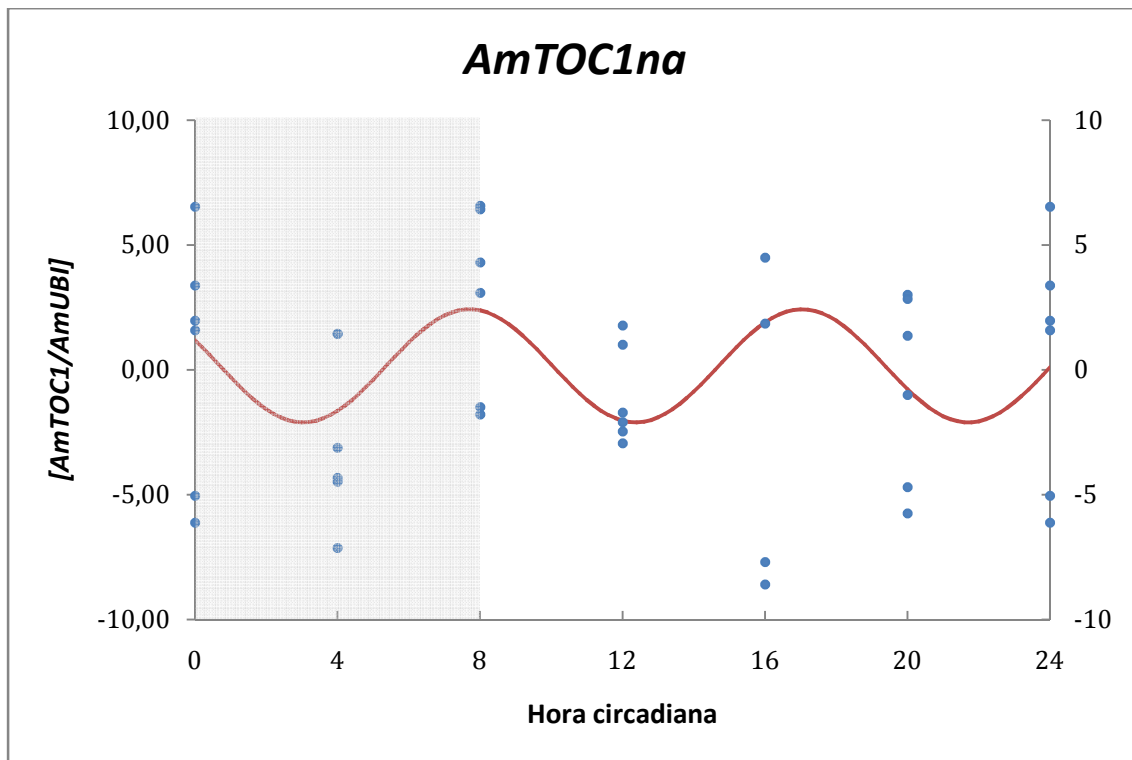


Figura 41. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *TIMING OF CAB 1* (*TOC1*) para el genotipo mutante *Antirrhinum majus nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja).

No obstante, no se trata de un asunto banal el intento de asignar una función de comportamiento a la nube de puntos de *AmTOC1* (figura 41) ya que muchas veces un análisis estadístico nos revela datos que a simple vista no somos capaces de apreciar. Por esta razón y, para asegurar que nuestro clon es acíclico calculamos la función sinusoidal que mejor se ajusta a *AmTOC1*. Dicha función arrojó una bondad r^2 del ajuste de 0.11. Del análisis realizado con XLfit® hemos obtenido la función más representativa con un valor de mesor de 0.16, una amplitud A de 2.27, un período τ estimado de 8-9 horas y, una fase φ de 2.67 horas (ecuación 5, figura 41).

$$y = 0.16 + 2.67 \sin(0.67x + 2.27) \quad (5)$$

En el análisis realizado con Rest® quedó patente la arritmia de nuestro clon ya que, por ejemplo, para las 4 horas de la noche tenemos diferencias significativas referentes a sobreexpresión e infraexpresión.

La observación de los datos expuestos en la figura 41, la función de ajuste y los resultados obtenidos de Rest® dejan en especial evidencia la posibilidad de que se trate de un comportamiento inadecuado en el sistema interno de *Antirrhinum majus nana* ya que la expresión del gen *TOC1* parece seguir un comportamiento acíclico.

5.3. Estudio del gen marcador *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)*

Dependiendo de cómo reciban la luz, se ha dividido tradicionalmente a los organismos eucarióticos fotosintéticos en tres grupos principales. Los *Clorófitos* (algas verdes y plantas superiores) tienen antenas receptoras de clorofila a/b, los *Cromófitos* tienen antenas receptoras de clorofila a/c, y los *Rodófitos* (algas rojas) solamente tienen receptores de clorofila a.

La función principal de los complejos de absorción fotosintética (LHC en lo sucesivo) es la absorción de luz y transferir la energía de excitación a los centros de reacción fotoquímica (Heddad & Adamska, 2000). Durante la fotosíntesis, la energía de la luz es capturada por pigmentos en las proteínas de los LHC y son transferidos posteriormente (como ya se ha citado) a los centros de reacción ubicados en los tilacoides de las membranas de las “plantas verdes”. Estos complejos (LHC) están asociados a los fotosistemas I y II (PSI y PSII en lo sucesivo). La mayoría de los LHC pertenecen al PSII, unos pocos al PSI y menos numerosos son los que pertenecen a ambos fotosistemas (Ganeteg, Strand, Gustafsson, & Jansson, 2001).

5.3.1. Estructura y filogenia del gen *AmCAB*

La familia CAB en *Arabidopsis thaliana* contiene al menos 30 miembros, asociados a PSI y PSII. Con el objeto de identificar si el gen de *Antirrhinum majus* se corresponde con el de *Arabidopsis thaliana* llevamos a cabo un apilamiento con ClustalX entre varias proteínas LHC (figura 42). Comparamos con *A. thaliana* debido a que la anotación del genoma de *Arabidopsis* se considera el estándar de oro para los estudios que se lleven a cabo en plantas.

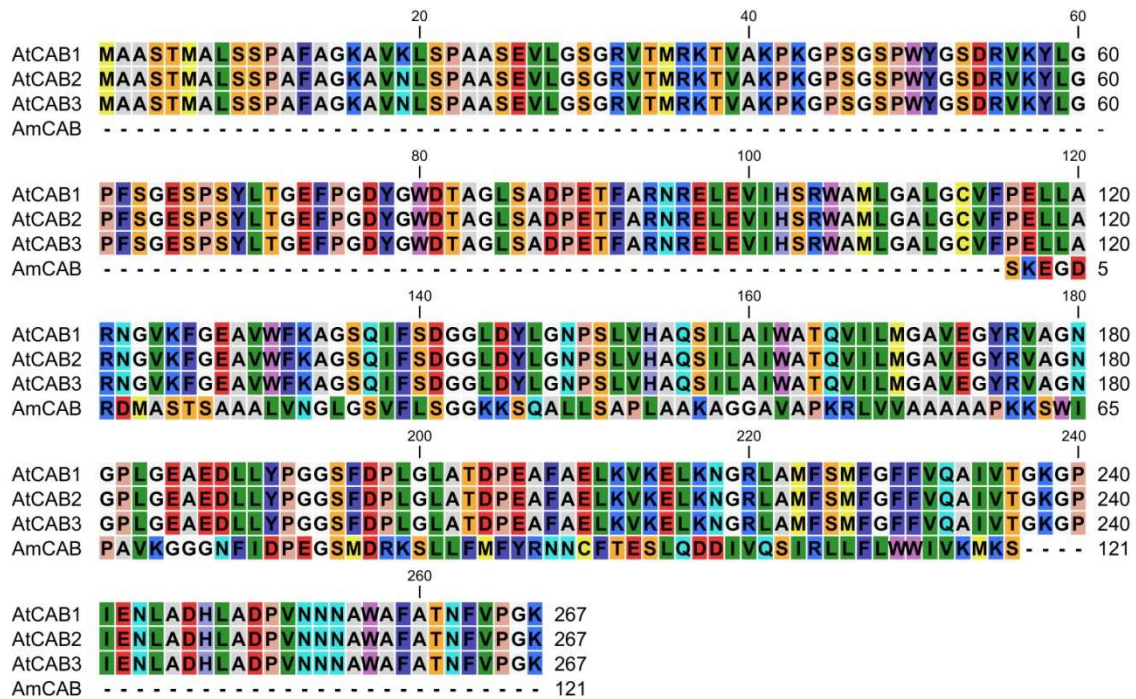


Figura 42. ClustalX de varias proteínas CAB. Am, *Antirrhinum majus* y; At, *Arabidopsis thaliana*.

Según la figura 42 podemos observar que la proteína AmCAB se encuentra bastante diferenciada de sus posibles homólogos en *Arabidopsis*. Esto se puede deber a la gran variedad de genes receptores de actividad fotosintética que existen en la naturaleza (solamente en *A. thaliana* hay 30 diferentes).

Por otra parte, si no tuviésemos estudios alternativos podríamos estar hablando de que el clon que tenemos para *A. majus* no corresponde a CAB, por lo que recurrimos a los estudios realizados con micromatrices (tabla 8) y comprobamos nuevamente la accesión de nuestro clon en “The *Antirrhinum majus* genetic and genomic database”. De todas formas, volvimos a optar por realizar un nuevo alineamiento de la proteína AmCAB con respecto a otras especies conocidas (figura 43). Con este apilamiento podemos confirmar que nuestro gen se trata definitivamente del CAB de *Antirrhinum majus* debido al grado de homología que presentan las proteínas comparadas.

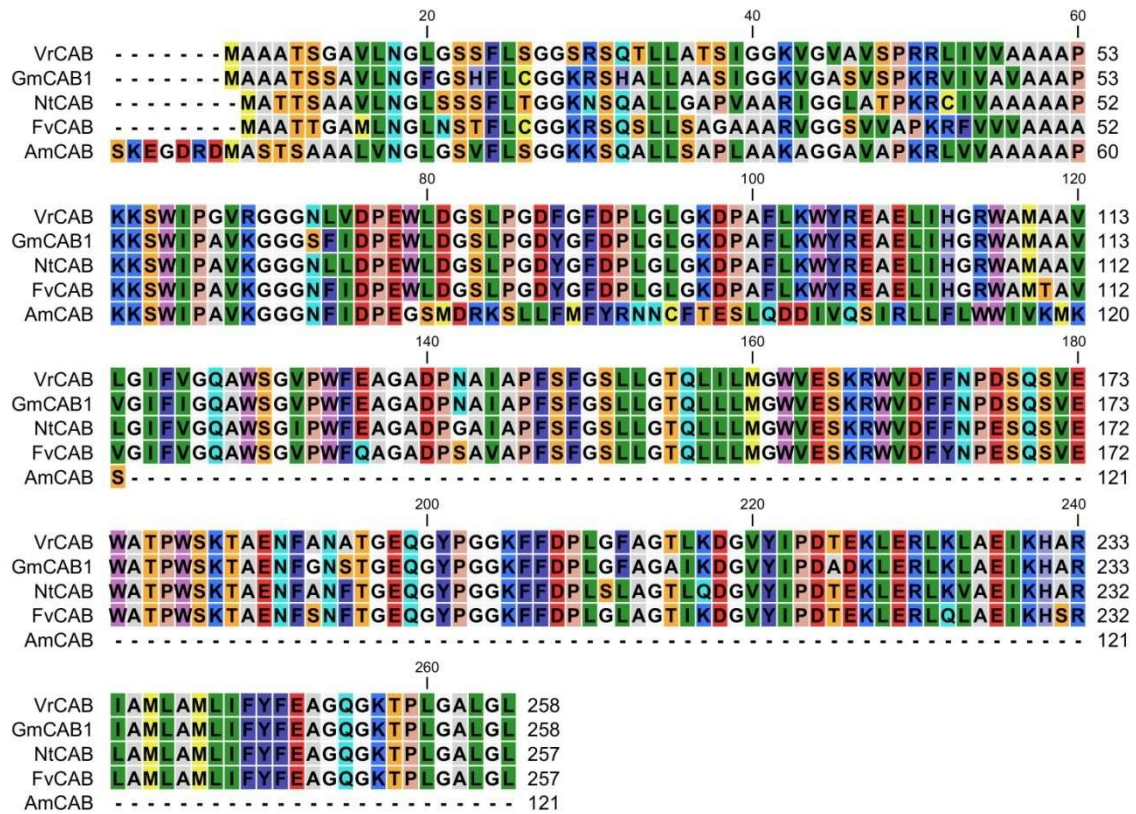


Figura 43. ClustalX de varias proteínas producto de CAB de varias especies. Vr, *Vigna radiata*; Gm, *Glycine max*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Fv, *Fragaria vesca*; Am, *Antirrhinum majus*.

Llevamos a cabo un segundo filogenético recolectando una serie de ortólogos de LHC y realizamos un árbol filogenético para, de esta forma, corroborar las primeras impresiones deducidas tras observar los resultados del ClustalX (figura 44).

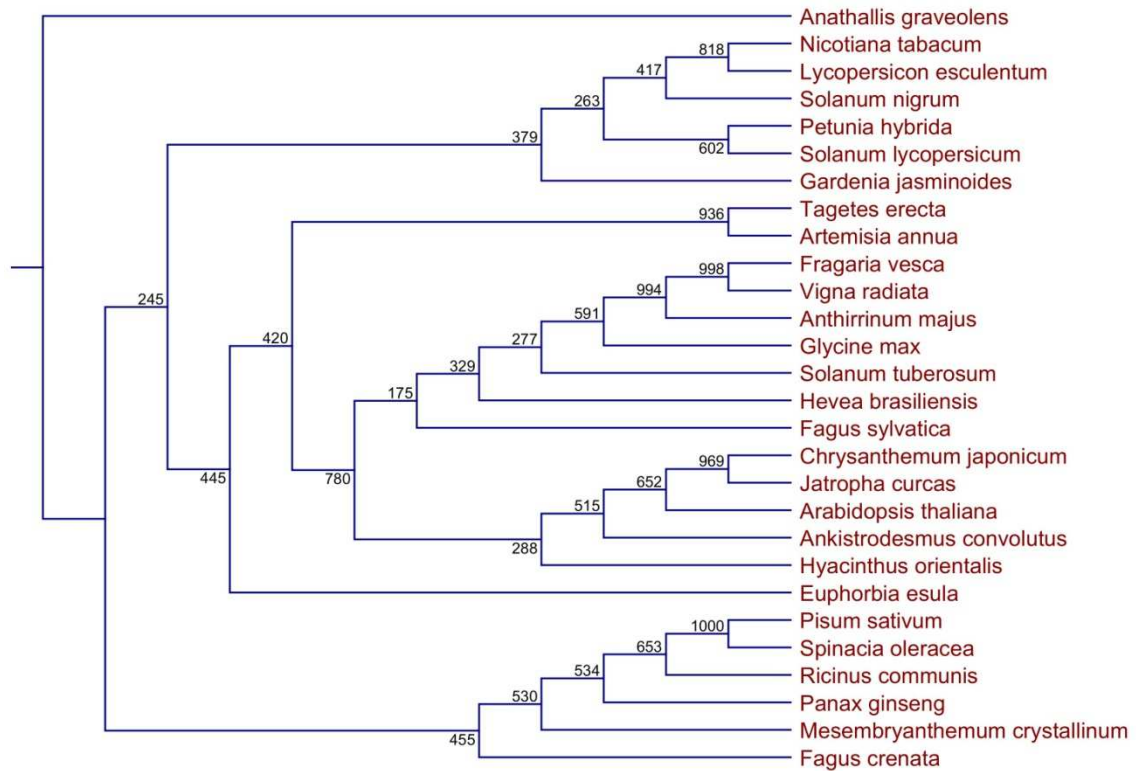


Figura 44. Árbol filogenético del gen *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN*. El árbol filogenético se ha llevado a cabo con CLC Sequence Viewer® utilizando el método Neighbor-joining. En los nodos aparecen los valores de Bootstrap (valores calculados a partir de 1.000 repeticiones).

Podemos comprobar visualizando la figura 44 que el gen de *Antirrhinum majus* se encuentra dentro de un clado que incluye *Fragaria vesca* (fresa salvaje; familia *Rosaceae*), *Vigna radiata* (poroto chino; familia *Fabaceae*), *Glycine max* (soja, *Fabaceae*) y algunas plantas más alejadas filogenéticamente como *Hevea brasiliensis* (árbol del caucho, *Euphorbiaceae*). El clado de mayor cercanía incluye a especies como *Arabidopsis thaliana* (especie de crucífera, *Brassicaceae*) o *Jatropha curcas* (jatrofa, *Euphorbiaceae*). Fuera del mismo se encuentran ya en otras ramas genes de *Pisum sativum* (guisante, *Fabaceae*) lo que indica que las diferencias observadas se corresponden con diferentes parálogos de la familia multigénica de CAB. Podemos concluir, por tanto, que el gen *AmCAB* que hemos utilizado es uno de los parálogos de esta familia multigénica.

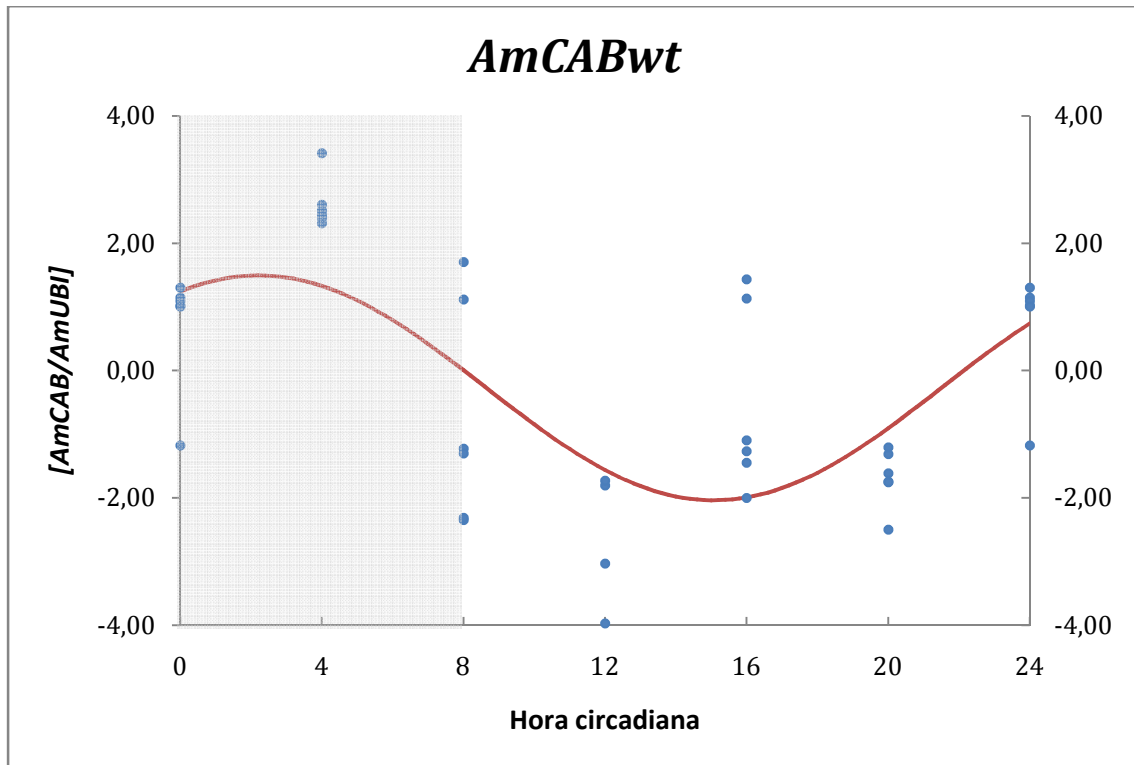
5.3.2. Control de *AmCAB* por el reloj circadiano

En este estudio presentamos los resultados obtenidos de analizar la expresión circadiana de *CAB* tanto en el genotipo mutante como en el silvestre. Este gen es comúnmente utilizado como marcador aguas abajo del reloj circadiano y nos da una visión externa de lo que podría estar ocurriendo dentro del reloj (Millar & Kay, 1996; Somers et al., 1998).

5.3.2.1. *AmCAB*, genotipo silvestre

En el primer análisis trabajamos con el genotipo silvestre de *AmCAB*. Así, tenemos en la figura 45 los datos referentes a las concentraciones de RNAm de *AmCAB* en silvestre para diferentes horas del día normalizados frente a la expresión de *AmUBI*. Para poder explicar de forma clara lo que está pasando hemos calculado una función sinusoidal que describe el comportamiento circadiano de este clon, cuya estructura ya comentamos en apartados anteriores.

Observando la función adoptada para el ajuste de *AmCAB* apreciamos que el máximo de expresión se produce por la noche justo antes de la salida del sol (8 horas) con una sobreexpresión del 400% sobre el gen de referencia y durante el día disminuye paulatinamente su expresión (valores situados entre -200 y -400%) para volver, esta vez a finales de la tarde, a reactivar la transcripción del locus *CAB* y a la traducción de proteínas *CAB* para comenzar un nuevo ciclo (en torno a una sobreexpresión de 150%). Este comportamiento nos muestra una primera implicación de *CAB* con los relojes de la noche y de la mañana (figura 45).



del 176%, esto quiere decir, frente a una expresión determinada como constante durante todas las horas del día y en cualquier tejido (*AmUBI* como gen constitutivo).

Del análisis de expresión relativa obtenido mediante el software Rest® hemos observado que existen significancias relativas (valor $p < 0.05$) para poder afirmar que tanto los valores de expresión de *AmCAB* entre las 8 horas y las 20 horas se encuentran significativamente bajos con respecto al máximo y, a su vez, los valores comprendidos entre las 0 y las 8 horas se encuentran sobreexpresados hasta encontrar un máximo con resultado significativamente diferente del resto en torno a las horas centrales de período nocturno (4 horas). Coincidiendo así con el modelo propuesto en la figura 45 a raíz de datos normalizados por Qbase+® para el comportamiento circadiano del gen *AmCAB*.

Observando el modelo matemático propuesto para el comportamiento de *AmCAB* vemos que los resultados obtenidos a raíz de Rest®, Qbase+® son coherentes con este último método de análisis (XLfit®). Por tanto, podemos afirmar que *AmCAB* se ciñe a una función sinusoidal (ecuación 4) en los que tenemos dos picos cuya expresión es significativamente diferente del resto, un mínimo que se sitúa durante el período diurno y un máximo durante el período nocturno.

5.3.2.2. *AmCAB, genotipo mutante*

En este segundo análisis trabajamos con *AmCAB en na* (figura 46). Para este caso no tenemos bibliografía a la que podamos comparar nuestros datos, ya que es un estudio novedoso.

Los datos de las tres réplicas biológicas aparecen en la figura 46 como una nube de puntos cuyo rango de variaciones de sobreexpresión e infraexpresión de *AmCAB* frente a *AmUBI* se sitúa en valores definidos entre 400 y -800% (datos mínimos no mostrados en el gráfico debido a su gran dispersión). Estos resultados coinciden con los del análisis de micromatrices en los que se estableció que *AmCAB* se encontraba reprimido en *na* frente al silvestre.

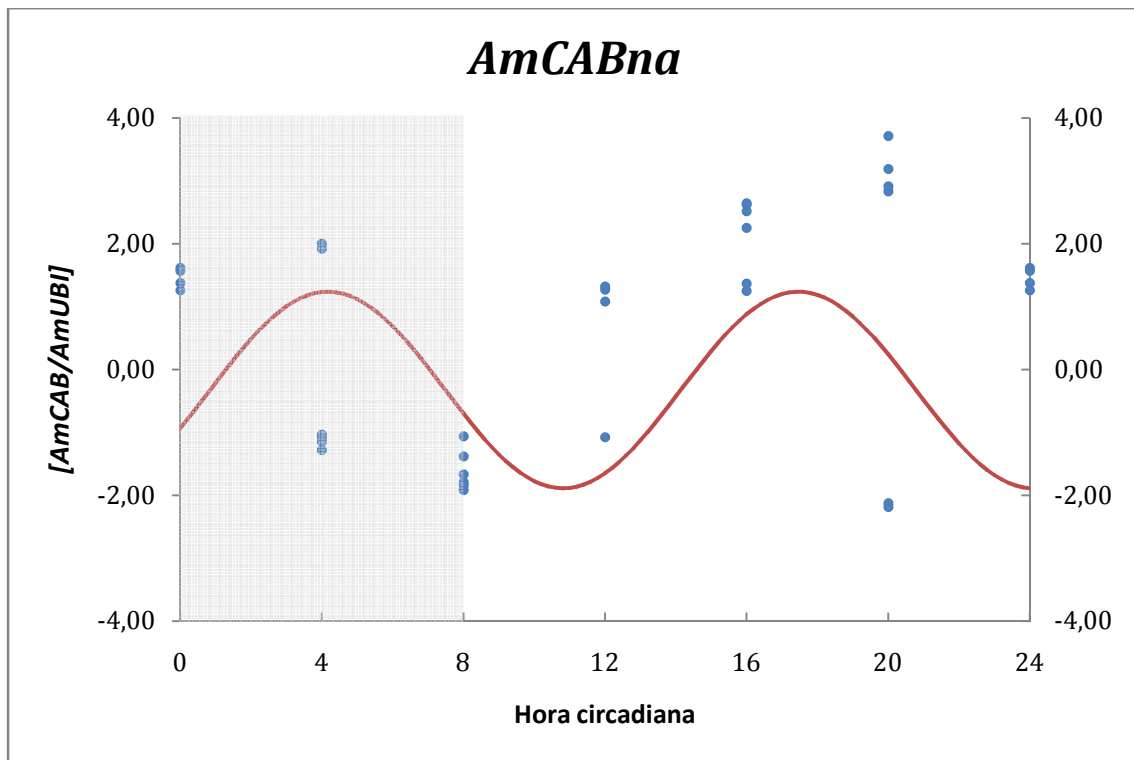


Figura 46. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)* para el genotipo mutante *Antirrhinum majus nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja).

Además, observando la tendencia de los datos apreciamos que no se sigue un patrón de expresión circadiano determinado, no obstante, se realizaron análisis matemáticos para corroborar nuestras primeras impresiones.

Atendiendo a la función que intenta explicar el comportamiento de nuestro clon en el genotipo mutante cabe mencionar que la bondad r^2 del ajuste es de 0.12. Debido a esta variación en los datos obtenidos nos ha sido imposible asignar una función que explique el comportamiento del clon *AmCAB* con la certidumbre necesaria. No obstante, del análisis realizado con XLfit® hemos obtenido la función más representativa del gen *AmCAB* con un valor de mesor de -0.33, una amplitud A de 1.56, un período τ estimado de 12 horas y, una fase φ de -0.4 horas (ecuación 7, figura 46).

$$y = -0.33 + 1.56 \sin(0.48x - 0.4) \quad (7)$$

Los resultados obtenidos en Rest® arrojan diferencias significativas para las diferentes réplicas biológicas. Dichas significancias se sitúan en diferentes horas del día y en puntos diferentes, es decir, para la misma hora del día podemos tener significancias relativas a sobreexpresión, infraexpresión o no variación. Estos resultados nos ofrecen la certeza suficiente para que, con el análisis anterior (figura 46) podamos afirmar que *AmCAB en na* es acíclico.

5.4. Estudio del gen *CONSTANS* (CO)

El gen *CONSTANS* pertenece a una familia de genes que tiene más de 10 miembros en *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (Griffiths, Dunford, Coupland, & Laurie, 2003). De todos ellos el único cuya función genética se ha estudiado con detalle es *CO*. Cumple una función de activación del gen *FLOWERING TIME* (*FT*) en plantas provocando la floración (Samach et al., 2000).

La familia de proteínas B-BOX representan un subgrupo de las proteínas ZINC FINGER que contienen uno o más dominios B-BOX con estructuras terciarias especializadas que se encuentran estables mediante la unión a iones de zinc. Estos dominios están involucrados en las interacciones a nivel de proteína y aún no es muy conocida cuál es su comportamiento a nivel bioquímico (Khanna et al., 2009). *CONSTANS* (CO) fue la primera proteína en ser identificada como B-BOX en *Arabidopsis* (Putterill, Robson, Lee, Simon, & Coupland, 1995). Además de CO, se ha publicado que otras 16 proteínas denominadas como CO-Like (COL) poseen uno o dos dominios B-BOX en la zona N-terminal (Strayer, 2000) y un dominio CCT (CO, COL, TOC1) en la zona C-terminal (Ledger, Strayer, Ashton, Kay, & Putterill, 2001).

5.4.1. Estructura y filogenia del gen *AmCO*

Con el objeto de identificar si el gen *AmCO* se corresponde con el de *A. thaliana* llevamos a cabo un apilamiento con ClustalX entre *AmCO* y *AtCO* (figura 47).

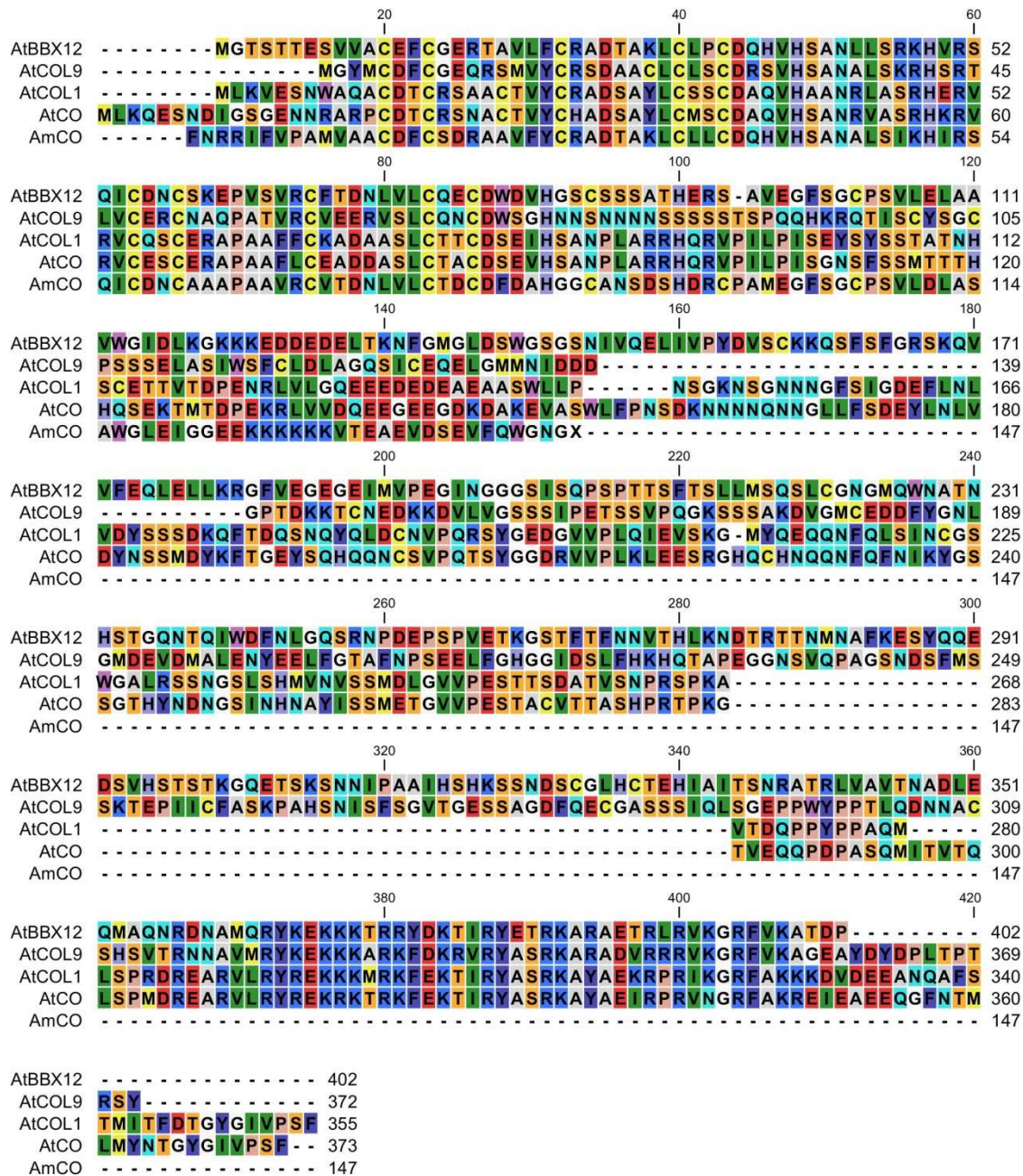


Figura 47. ClustalX de CONSTANS. Am, *Antirrhinum majus* y; At, *Arabidopsis thaliana*. BBX, proteínas B-BOX denominadas también como COL; COL, CONSTANS-LIKE denominadas también como proteínas B-BOX.

Observamos que el grado de homología de nuestra proteína con sus ortólogos es alto y resaltamos que el clon de que disponemos se corresponde con la zona 5' (N-terminal) de la proteína debido a que coincide con las metioninas del resto.

Para comprobar si nuestro clon realmente carecía de la zona 3' (C-terminal) realizamos un ClustalX con varias ortólogas (figura 48).

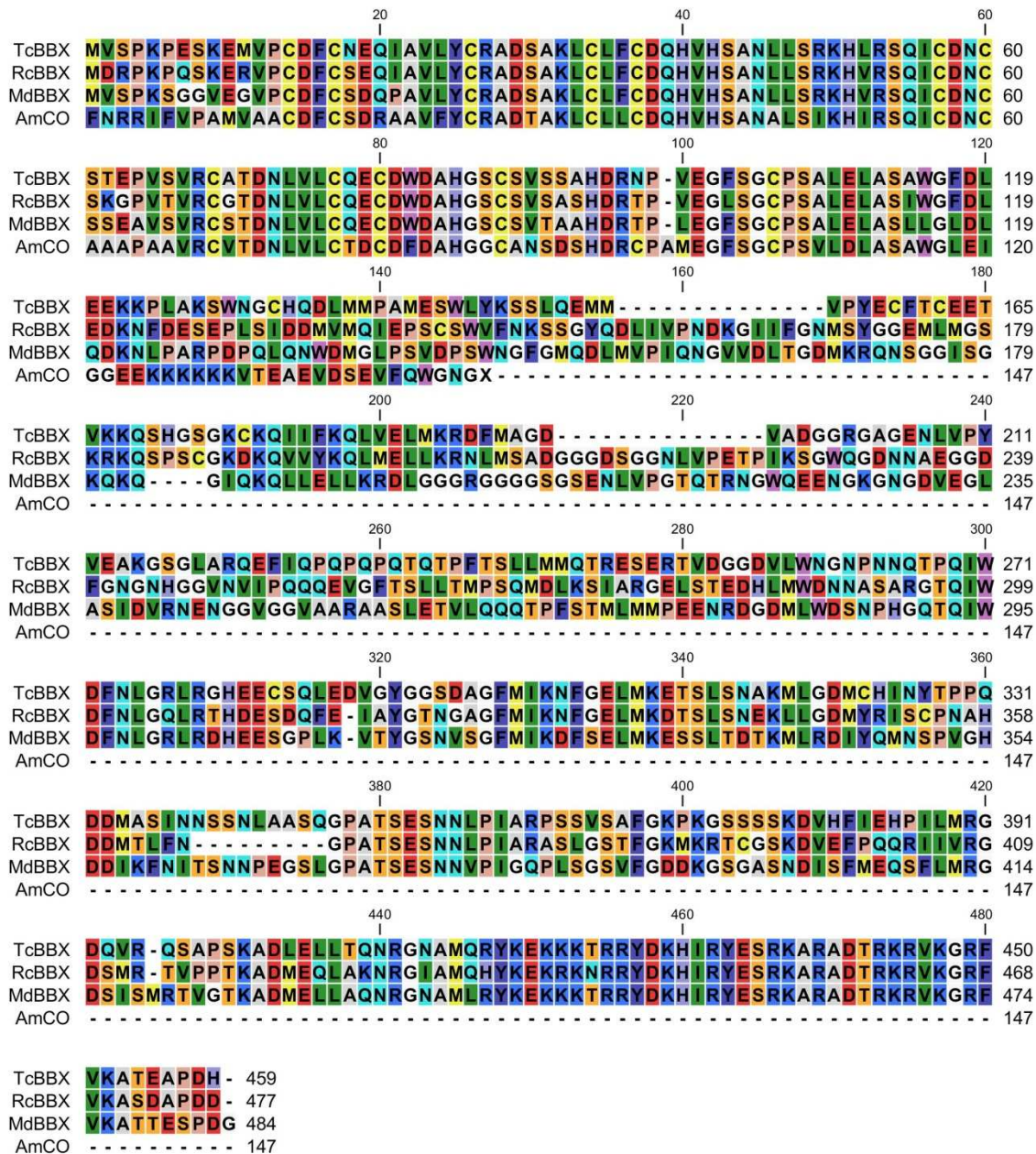


Figura 48. ClustalX de CONSTANS. Tc, *Theobroma cacao*; Rc, *Ricinus communis*; Md, *Malus domestica*; Am, *Antirrhinum majus*. BBX, B-BOX.

Para determinar si el clon *AmCO* es un ortólogo a *AtCO*, entre otros, llevamos a cabo un árbol filogenético (figura 49) con varios genes de la familia *CO* incluyendo el gen de *Chlamydomonas reinhardtii* *CrCo* (Serrano et al., 2009).

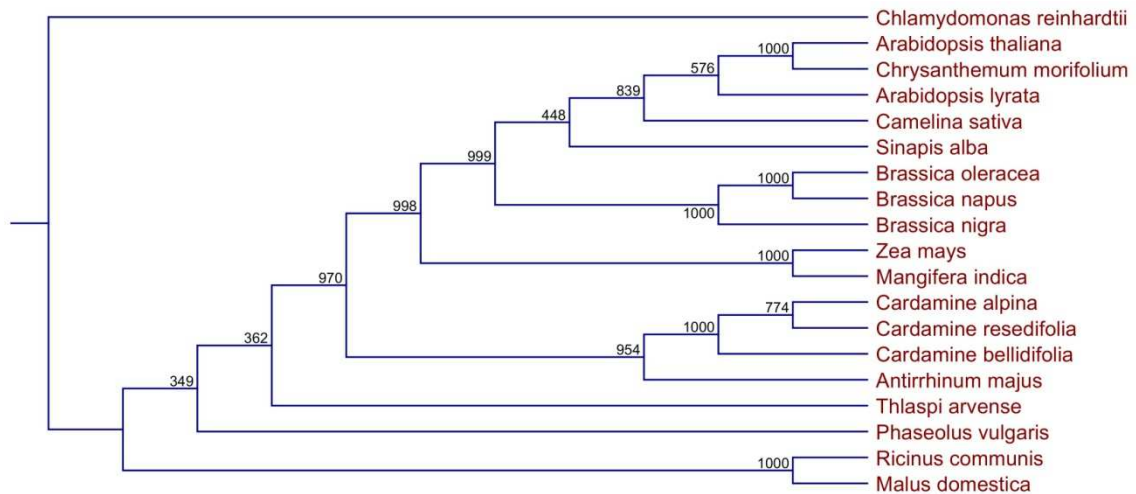


Figura 49. Árbol filogenético del gen *CONSTANS*. El árbol filogenético se ha llevado a cabo con CLC Sequence Viewer® utilizando el método Neighbor-joining. En los nodos aparecen los valores de Bootstrap (valores calculados a partir de 1.000 repeticiones).

Del árbol filogenético que hemos realizado para una serie de ortólogos a *AmCO* observamos que nuestro clon se encuentra dentro de un clado con varios genes pertenecientes al género de plantas *Cardamine L.* (berro amargo, familia *Brassicaceae*). El clado de mayor cercanía incluye a especies como *Thlaspi arvense* (carraspique, familia *Brassicaceae*) o *Phaseolus vulgaris* (judía, familia *Fabaceae*). En clados más lejanos se encuentran especies como *Zea mays* (maíz, familia *Poaceae*) o *Mangifera indica* (mango, familia *Anacardiaceae*). Finalmente, estas observaciones nos indican que las diferencias observadas se corresponden con diferentes parálogos de la familia multigénica de *CO* y que el clon de que disponemos, *AmCO*, pertenece a esta familia multigénica.

5.4.2. Control de *AmCO* por el reloj circadiano

CO actúa aguas debajo de una cascada de señales que incluye procede a través del reloj circadiano y de *GIGANTEA*. Bajo condiciones de días largos, se ha publicado que el RNAm de *CO* muestra una expresión bifásica en los que los niveles de productos transcritos sufren un aumento justo después del RNAm de *GI* al final del día, mientras las plantas estén expuestas a la luz y, un segundo pico de expresión de los transcritos durante la noche (Suárez-López et al., 2001b). Es importante resaltar que la expresión del gen *CO* no sigue un patrón sinusoidal como ocurre con otros genes que se encuentran aguas abajo del reloj.

5.4.2.1. *AmCO*, genotipo silvestre

Al igual que en los estudios genéticos anteriores, se ha realizado un análisis de expresión génica para el gen *AmCO* en silvestre (figura 50) para determinar si existe algún patrón en su expresión a lo largo del día y poder corroborar nuestros datos otros estudios realizados sobre *CO* en otras especies.

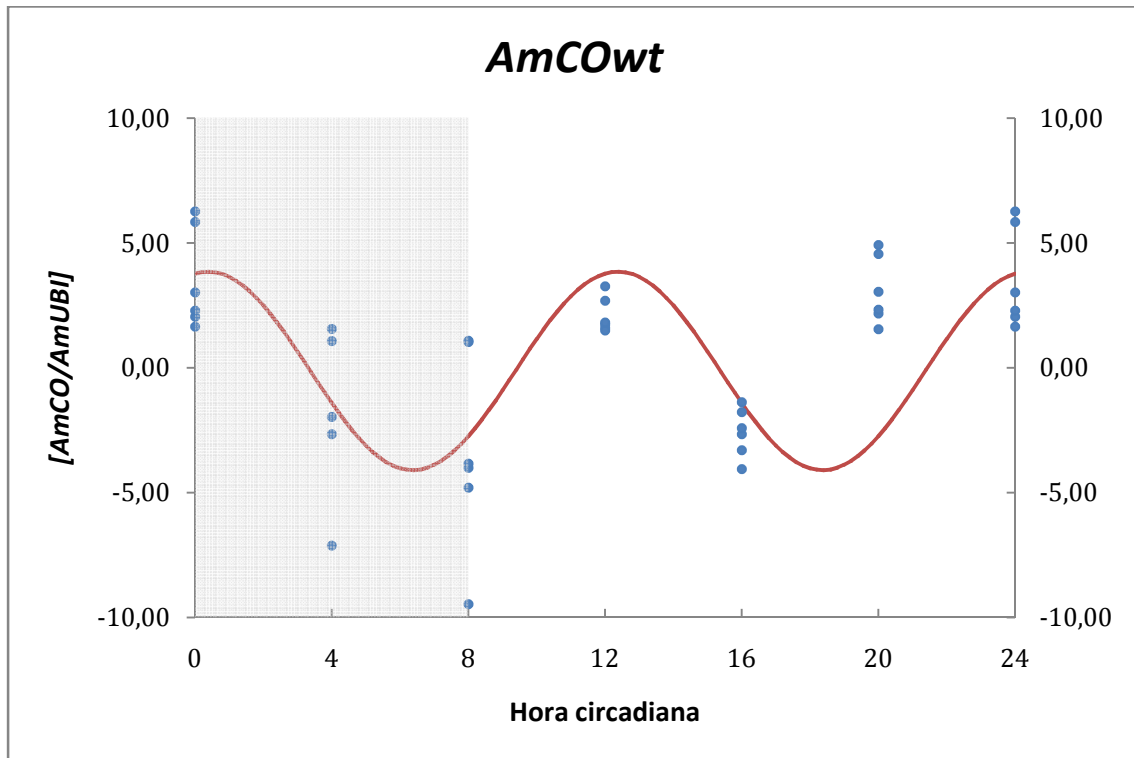


Figura 50. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *CONSTANS (CO)* para el genotipo silvestre *Antirrhinum majus Nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja).

El estudio llevado a cabo representa los valores de RNAm para nuestro clon a lo largo de un día de 24 horas. Dichos valores han sido recolectados y normalizados a través del software MxPro®, R®, Qbase+®, Excel®, XLfit® y Rest®.

Los datos representados referentes a la expresión absoluta de los transcritos de *AmCO* siguen un patrón establecido. Dicho patrón muestra dos zonas horarias del día con picos de sobreexpresión y otras dos zonas con picos de infraexpresión, dando la sensación

de que se ajusta a un período circadiano de 12 horas de duración. La concentración máxima de RNAm de *CO* se sitúa a las 12 horas con una sobreexpresión de 3.5 veces la de *AmUBI*, no obstante, el segundo pico de expresión que observamos está comprendido entre las 20 horas y pocos instantes antes de las 4 de las horas con niveles de sobreexpresión cercanos a 7 veces los de *UBI*. Sin embargo, los niveles absolutos de expresión de *CO* han demostrado ser bastante inferiores a los de sobreexpresión llegando a ser 10 veces inferiores a *UBI* a las 4 y 8 horas respectivamente. El segundo pico de infraexpresión se sitúa en torno a las 16 horas con alrededor de un 25% (4 veces inferior) la expresión para esos instantes de *AmUBI*.

El modelo matemático que propuesto para el comportamiento circadiano de nuestro clon se corresponde, de igual forma, a una función sinusoidal cuya bondad r^2 del ajuste ha sido de 0.47. Un valor de mesor de -0.13, una amplitud A de 3.98, un período τ estimado de 12 horas y, una fase φ de 1.37 horas definen los parámetros de la función (ecuación 8, figura 50).

$$y = -0.13 + 3.98 \sin(0.52x + 1.37) \quad (8)$$

Atendiendo a las características de la función, apreciamos que esta vez no tenemos un ajuste de un período de 24 horas sino que el mejor ajuste para el comportamiento de nuestros datos se corresponde con una función cuyo período sea de 12 horas, hecho que viene a corroborar las primeras impresiones obtenidas a raíz de la discusión de los datos graficados (figura 50). La idoneidad del análisis ha arrojado un valor de amplitud de 3.98, o lo que es lo mismo, que nuestro clon sigue una función periódica con valores cercanos a 4 veces superiores e inferiores los de *AmUBI*.

En el análisis estadístico llevado a cabo con Rest® hemos tenido valores con diferencias significativas (valor $p < 0.05$) coherentes a lo descrito para la figura 50. De este modo, para todos los puntos analizados entre las 4 y las 8 horas tenemos infraexpresiones significativas, así como para los puntos comparados a las 16 horas con el resto de máximos. Por otra parte, hemos obtenido diferencias significativas también para los dos máximos de expresión que vemos en los datos de expresión de los transcritos así como en la función modelo. Esto es, para las 12 horas y para el período comprendido entre las 20 y las 2 horas del día siguiente tenemos valores significativamente altos.

Por tanto, podemos afirmar que nuestro clon se comporta de acuerdo a un período circadiano de 12 horas de duración con máximos de expresión a las 12 horas y entre el período 20-2 horas, situando los mínimos entre los períodos 4-8 horas y 16 horas del día circadiano.

5.4.2.2. *AmCO*, genotipo mutante

En este epígrafe pasamos a realizar el análisis de los transcritos de RNAm de *AmCO* en *na* y su función de ajuste (figura 51).

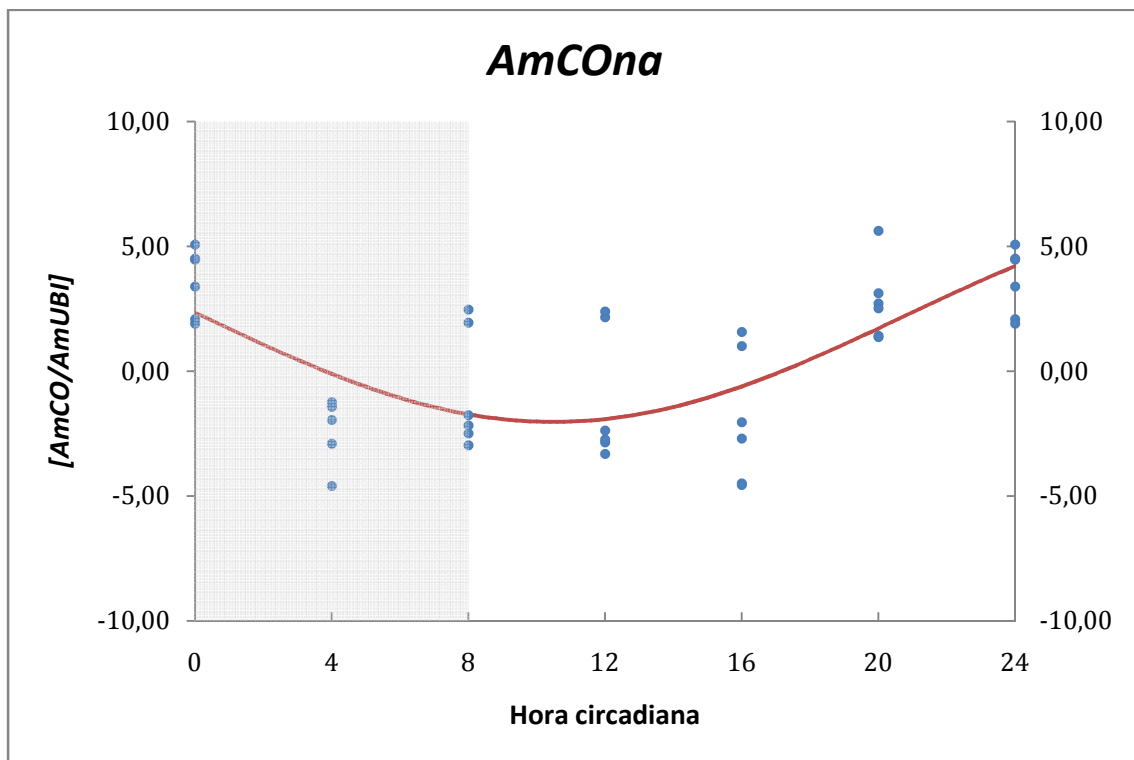


Figura 51. Representación gráfica de la expresión absoluta del gen *CONSTANS (CO)* para el genotipo mutante *Antirrhinum majus nana* en los que se han tenido en cuenta 3 individuos con dos repeticiones técnicas para cada una (formas redondeadas). La parte sombreada indica el período nocturno (0 a 8 horas) mientras que la no sombreada indica el período diurno (8 a 24 horas). Además, se presenta una función de tendencia de la serie de datos ajustada a un modelo sinusoidal (línea roja).

En análisis llevado a cabo sobre la expresión de *AmTOC1*, *AmCAB* y sus implicaciones en el reloj circadiano de *Antirrhinum majus Nana* nos llevó al principal objetivo de nuestro proyecto, determinar si el mutante *nana* está realmente afectado en el reloj circadiano. Pues bien, de aquellos estudio observamos que tanto *AmCAB* como

AmTOC1 presentaban claros signos de arritmia en *na*, lo que unido a que *CO* es un gen que se sitúa aguas abajo del reloj circadiano el único resultado posible sería que a *AmCO* no se le pudiese asignar un patrón circadiano. Tal es el caso que, observando el gráfico referente a la figura 51 observamos que los datos de RNAm de *CO* se presentan en una nube difusa de puntos alrededor del eje central sin apariencia de ritmicidad. No obstante, y para salir de dudas realizamos un ajuste con XLfit® del mismo modo en que lo hicimos para los estudios anteriores. Dicha función arrojó una bondad r^2 del ajuste de 0.48, muy similar al valor obtenido para el ajuste de *AmCO* en silvestre. Sin embargo, y a pesar de que la bondad del ajuste sea considerada como para tenerla en cuenta el elemento que finalmente nos hace desestimar un posible ritmo circadiano para *AmCO* en *na* es el período al cual se ajusta el modelo (~ 40 horas). La función más representativa, con un valor de mesor de 2.17, una amplitud A de 4.20, un período τ estimado de 40 horas y, una fase ϕ de -3.18 horas (ecuación 9, figura 51) queda de la siguiente forma:

$$y = 2.17 + 4.20 \sin(0.15x - 3.18) \quad (9)$$

Los valores obtenidos de Rest® han corroborado el ajuste propuesto ya que existen diferencias significativas relativas en *na* al período comprendido entre las 4 y las 16 horas en los que la represión de *AmCO* se hace patente (valor $p < 0.05$).

6. Discusión

Cada vez se van publicando más y más artículos científicos tratando de explicar el cómo, cuándo y por qué del reloj circadiano y los elementos que lo integran. Dado el gran auge que está experimentando este proceso aún un tanto desconocido se debe al gran número de procesos con el que se relaciona. Por tanto, resulta crucial el entender cómo funciona el reloj circadiano para poder comprender mejor procesos fisiológicos de las plantas como las respuestas a estreses ambientales, la subida a flor o incluso la muerte.

Para cerciorarnos de que los clones que disponíamos en el laboratorio se correspondían con los genes de *Antirrhinum* con los que en realidad queríamos trabajar realizamos estudios de comparativa estructural y filogenia para determinar el grado de homología de sus secuencias con las de otras plantas cuyo genoma es conocido.

Posteriormente tratamos de demostrar si la mutación que afecta a *Antirrhinum majus Nana* altera los procesos relacionados con el reloj circadiano y para ello hemos considerado estudiar la ritmicidad o no de tres genes implicados de forma directa e indirecta en el reloj. Para comparar los resultados obtenidos de *Antirrhinum majus nana* escogimos trabajar con *Antirrhinum majus Nana* como control silvestre al mutante. De esta forma, pudimos establecer comparaciones entre el funcionamiento correcto del reloj circadiano para los genes a estudio frente al reloj de *nana*.

6.1. TIMING OF CAB 1, la arritmia de un gen fundamental

El primer gen que estudiamos fue *TOC1*. Un gen fundamental para el correcto funcionamiento del reloj circadiano ya que interviene moderando tanto el reloj de la mañana como el de la noche situándose en la zona central del reloj (De Montaigu et al., 2010).

Los resultados obtenidos a partir del estudio de filogenia y comparativa estructural nos dieron la certeza de que el clon de que disponemos se trataba realmente de un parálogo de una gran familia multigénica. Sin embargo, atendiendo al estudio

llevado a cabo de comparativa estructural (figuras 38 y 39) pudimos apreciar que el clon de *AmTOC1* de que disponemos está completo en la zona 5' (N-terminal) ya que coincide con las metioninas de los demás parálogos puestos a escena y, por otra parte, apreciamos también que carecíamos de la zona 3' (C-terminal). Esta característica de nuestro fragmento no nos impide el llevar a cabo nuestros estudios pero sería conveniente la clonación completa del gen para desarrollar trabajos posteriores que incluyan estudios en el área incompleta. Estudios acerca de la proteína TOC1 en *Antirrhinum* ya que con el fragmento completo se podrían desarrollar trabajos hasta ahora inexplorados.

El estudio que llevamos a cabo sobre *TOC1* y el control que ejerce sobre el reloj circadiano en el genotipo silvestre nos reportó un ajuste relacionado a una función sinusoidal de período τ de 24 horas y una amplitud A de 9.03 (figura 40). Este modelo propuesto para el comportamiento de *AmTOC1* en silvestre nos revela que forma parte del reloj central modulando tanto los relojes de la mañana como los de la tarde. Esto es así porque, aunque veamos el pico de expresión de RNAm de *AmTOC1* a las 8 horas de la mañana se puede dar por sentado que el producto proteico TOC1 se pueda dar en torno a las 10-12 de la mañana y entonces, llevar a cabo numerosos procesos ya descritos para dicha proteína. Los datos obtenidos para la expresión de *TOC1* y la función matemática propuesta para su comportamiento son coherentes con estudios llevados a cabo por otros investigadores para el comportamiento del mismo gen en *Arabidopsis* (Somers et al., 1998).

Hemos demostrado también como el genotipo mutante *Antirrhinum majus nana* tiene una clara alteración en la función circadiana de *TOC1* (figura 41). Los datos que hemos obtenidos después de diversos análisis estadísticos nos revelan que nuestro clon no se ajusta a ninguna función periódica y menos a algún patrón de comportamiento ya establecido, confirmado posteriormente por el pésimo ajuste de la función sinusoidal propuesta (r^2 de 0.11) y por los resultados referentes a la expresión relativa del gen.

6.2. *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN, un gen controlado por el reloj*

El segundo gen que llevamos a estudio fue *CAB*. Este gen que funciona aguas abajo del reloj ha sido utilizado en numerosos estudios como un gen marcador del reloj circadiano al reflejar su expresión el estado del reloj (Kolmos, Schoof, Plümer, & Davis, 2008; McWatters et al., 2000; Somers et al., 1998).

El estudio sobre comparativa estructural nos puso de manifiesto la gran variabilidad de transcritos de CAB que existen. Del ClustalX de AtCAB y sus ortólogos frente a la paróloga AmCAB llegamos a la conclusión de que el grado de homología es bastante bajo (figura 42), por lo que decidimos llevar a cabo otro estudio de comparativa para cerciorarnos de que nuestro clon pertenecía al gen *AmCAB* (figura 43). El ClustalX de AmCAB con varias proteínas de especies como *Vigna radiata*, *Nicotiana tabacum* o *Fragaria vesca*, entre otras, mostraron un alto grado de homología estructural. Al igual que ocurría para *AmTOC1* el clon de que disponemos está completo en la zona 5' (N-terminal) e incompleto en la zona 3' (C-terminal) por lo que también sería necesario una clonación para este gen si en un futuro se quiere trabajar en esta línea.

Lo que finalmente nos hizo pensar que nos encontramos frente al verdadero CAB de *Antirrhinum majus* y de que también se trataba una familia multigénica fue el estudio sobre la filogenia del gen llevado a cabo (figura 44).

Hemos visto que en el estudio realizado sobre la expresión circadiana de *AmCAB* en silvestre se ajusta a un patrón cuyo comportamiento parece ser periódico. La función sinusoidal que ha reportado un ajuste r^2 de 0.45 de período τ de 24 horas y una amplitud A de 1.76 (figura 45) tiene su máximo de expresión durante la noche. Tratando estos resultados conjuntamente con los obtenidos para *AmTOC1* podemos afirmar que el reloj activa a *TOC1* al final del período nocturno y sus posteriores transcritos al final de un ciclo del reloj circadiano hacen que el gen *AmCAB* tenga su máxima expresión entre finales del día y primeras horas del día siguiente ya que como hemos dicho anteriormente, se trata de un producto del propio reloj. Esta primera afirmación coincide con trabajos publicados anteriormente (Somers et al., 1998).

El estudio en el que el gen de referencia era el clon *AmCAB* nos ofreció los resultados esperados atendiendo a los vistos para el comportamiento de *AmTOC1*. La función de ajuste para los datos obtenidos a raíz del RNAm de CAB arrojó una bondad r^2 del ajuste lo que nos invita a afirmar que desde que el reloj se encuentra distorsionado por el origen de la mutación de *Antirrhinum majus nana* todos los transcritos aguas abajo lo estarán igualmente. Por tanto, llegamos a la conclusión de que el comportamiento de AmCAB es arrítmico.

6.3. *CONSTANS*, el último paso hacia la floración

Se ha demostrado que el gen *CONSTANS* se encuentra aguas abajo del reloj circadiano de *Arabidopsis* y que tiene como función, modulado por *GIGANTEA* (*GI*), de promover el *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), es decir, su expresión en días largos promueve los procesos de floración en plantas (Boss, Bastow, Mylne, & Dean, 2004; Samach et al., 2000).

Esta vez, para el estudio relativo a la comparativa estructural entre *AtCO* y *AmCO* pudimos observar un alto grado de homología en la conservación de las cadenas de aminoácidos apiladas (figura 47). Por otra parte, el ClustalX llevado a cabo con parálogas de *AmCO* de otras especies diferentes de *Arabidopsis* también reportaron un alto grado de homología (figura 48). Pudimos determinar mediante el estudio del árbol filogenético que el gen *CO*, aunque presentaba claras divergencias entre unas especies y otras la diferenciación que ha sufrido a lo largo de la evolución ha sido mucho menor que la que han sufrido los otros genes puestos a estudio (*TOC1* y *CAB*). Por otra parte, podemos afirmar que *CO* pertenece a una familia multigénica aún mayor que las familias multigénicas a las que pertenecen tanto *TOC1* como *CAB*. Estas observaciones nos llevan a poder afirmar que el mecanismo de floración es un proceso bastante conservado a nivel de redes de genes.

La expresión circadiana del gen *AmCO* no es tan importante como lo son sus proteínas ya que su función es fundamental. *CONSTANS* está regulada por numerosos procesos de represión en la célula vegetal que hace que el estudio acerca de la expresión génica de su secuencia-origen pase a un plano secundario. De todas formas, casi toda la bibliografía estudia el comportamiento de los represores de *CO* y su principal output, *FT*. No obstante, hemos determinado una función periódica cuyo periodo τ circadiano se ha estimado en 12 horas y una amplitud *A* de 3.98 y un ajuste r^2 de 0.47 (figura 50). La expresión del gen *CO* tiene dos máximos situados a las 12 horas y en el período 20-2 horas coincidiendo con publicaciones realizadas por otros autores (Fornara et al., 2009).

El análisis estadístico llevado a cabo para determinar una función periódica a *AmCO* en *na* nos llevó a asignarle una función de periodo τ de 40 horas y una amplitud *A* de 3.98 y un ajuste r^2 de 0.47 (figura 50). Claramente no se ajusta a una función circadiana por lo que, según cabía de esperar, *AmCO* no sigue ningún patrón de expresión circadiana en *na*.

7. Conclusiones

La regulación del reloj circadiano en plantas es un proceso del que no conocemos mucho, incluso en *Arabidopsis* lo que ayer se publicaba como cierto hoy se publica como falso. Esta es la gran riqueza de la investigación y, dicho de esta forma, parece un tanto catastrófico.

Pongámonos en situación. Cuando se publica un trabajo científico las conclusiones a las que llega el investigador no se deben a incertidumbres infundadas que le surgen como inspiración a la hora de escribir sino que son los datos crudos obtenidos a partir de su trabajo los que, tratados de una forma u otra, son los que le llevan a explicar un evento. Esto es así desde que la ciencia tiene razón de existir y no nos quepa duda de que, aunque se empezase a entender la ciencia como la entendemos a día de hoy con la revolución científica originada en el siglo XVII, ésta existe desde que cualquier ser de nuestro planeta mostrase un ápice de curiosidad por el entorno que le rodea.

Por tanto y, atendiendo a lo que nos muestran los datos obtenidos, podemos afirmar que el mutante *Antirrhinum majus nana* está afectado en el reloj circadiano debido a que tras el estudio de tres genes uno de ellos así lo ha demostrado.

Por otra parte, hemos establecido unas primeras pautas acerca del comportamiento del reloj en *Antirrhinum majus* con el estudio de la expresión circadiana de genes involucrados en los procesos del reloj como *TIMING OF CAB 1*, *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN* y *CONSTANS*. Llegamos pues a la conclusión de que *AmTOC1* juega un papel fundamental en el control del reloj y que tanto *CAB* como *CO* han mostrado comportamientos circadianos coherentes con publicaciones de otros autores.

8. Bibliografía

- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M. J., Harmon, F. G., Mas, P., & Kay, S. A. (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 293(5531), 880–883. doi:10.1126/science.1061320 293/5531/880 [pii]
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (McGraw-Hil.). Universitat de Barcelona.
- Barrero, P. R. (2005). Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias biomédicas: presente y futuro. *Química Viva*, 3.
- Baur, E. (1924). *Die wissenschaftlichen Grundlagen der Pflanzenzüchtung*. Verlag von Gebrüder Borntraeger.
- Boase, M. R., Lewis, D. H., Davies, K. M., Marshall, G. B., Patel, D., Schwinn, K. E., & Deroles, S. C. (2010). Isolation and antisense suppression of flavonoid 3', 5'-hydroxylase modifies flower pigments and colour in cyclamen. *BMC plant biology*, 10, 107. doi:10.1186/1471-2229-10-107
- Boss, P. K., Bastow, R. M., Mylne, J. S., & Dean, C. (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *The Plant cell*, 16 Suppl, S18–31. doi:10.1105/tpc.015958
- Brand, M. H. (2006). Ornamental Plant Transformation. *Journal of Crop Improvement*, 17(1-2), 27–50. doi:10.1300/J411v17n01_02
- Brücher, H. (1943). Experimentelle Untersuchungen über den Selektionswert künstlich erzeugter Mutanten von *Antirrhinum majus*. *Z. f. Bot.*, 1–47.

- Cartolano, M., Castillo, R., Efremova, N., Kuckenberg, M., Zethof, J., Gerats, T., Schwarz-Sommer, Z., et al. (2007). A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nature genetics*, 39(7), 901–5.
- Cazzonelli, C. I., & Pogson, B. J. (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in plant science*, 15(5), 266–74. doi:10.1016/j.tplants.2010.02.003
- Century, K., Reuber, T. L., & Ratcliffe, O. J. (2008). Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. *Plant physiology*, 147(1), 20–9. doi:10.1104/pp.108.117887
- Chandler, S. F., & Sanchez, C. (2012). Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant biotechnology journal*, 10(8), 891–903. doi:10.1111/j.1467-7652.2012.00693.x
- Chang, C., Chen, Y.-C., Hsu, Y.-H., Wu, J.-T., Hu, C.-C., Chang, W.-C., & Lin, N.-S. (2005). Transgenic resistance to Cymbidium mosaic virus in *Dendrobium* expressing the viral capsid protein gene. *Transgenic Research*, 14(1), 41–46. doi:10.1007/s11248-004-2373-y
- Chen, W.-H., Hsu, C.-Y., Cheng, H.-Y., Chang, H., Chen, H.-H., & Ger, M.-J. (2011). Downregulation of putative UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports*, 30(6), 1007–1017. doi:10.1007/s00299-011-1006-1
- Clarke, J. L., Spetz, C., Haugslie, S., Xing, S., Dees, M. W., Moe, R., & Blystad, D.-R. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to Poinsettia mosaic virus. *Plant cell reports*, 27(6), 1027–38. doi:10.1007/s00299-008-0526-9
- Colquhoun, T. A., Schimmel, B. C. J., Kim, J. Y., Reinhardt, D., Cline, K., & Clark, D. G. (2010). A petunia chorismate mutase specialized for the production of floral volatiles. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(1), 145–55. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04042.x

- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., et al. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, *316*(5827), 1030–3. doi:10.1126/science.1141752
- Covington, M. F., Panda, S., Liu, L., Strayer, C. A., Wagner, D. R., & Kay, S. A. (2001). ELF3 Modulates Resetting of the Circadian Clock in *Arabidopsis*, *13*(June), 1305–1315.
- David, D., & Vergara, G. (2009). Utilización de giberelinas en explantes vegetales. *Seminario de Crecimiento y Desarrollo* (pp. 1–20).
- De Montaigu, A., Tóth, R., & Coupland, G. (2010). Plant development goes like clockwork. *Trends in genetics : TIG*, *26*(7), 296–306. doi:10.1016/j.tig.2010.04.003
- Dixon, L. E., Knox, K., Kozma-Bognar, L., Southern, M. M., Pokhilko, A., & Millar, A. J. (2011). Temporal repression of core circadian genes is mediated through EARLY FLOWERING 3 in *Arabidopsis*. *Current biology : CB*, *21*(2), 120–5. doi:10.1016/j.cub.2010.12.013
- Dobres, M. S. (2011). Prospects for commercialisation of transgenic ornamentals. In B. Mou & R. Scorza (Eds.), *In Transgenic Horticultural Crops; Challenges and Opportunities* (Boca Raton., pp. 305–316).
- Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, *11*:1–42.
- Dunlap, J. C., Loros, J. J., & DeCoursey, P. J. (2004). *Chronobiology: biological timekeeping*.
- Edwards, K. D., Anderson, P. E., Hall, A., Salathia, N. S., Locke, J. C. W., Lynn, J. R., Straume, M., et al. (2006). FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high-temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant cell*, *18*(3), 639–50. doi:10.1105/tpc.105.038315
- Edwards, K. D., Lynn, J. R., Gyula, P., Nagy, F., & Millar, A. J. (2005). Natural allelic variation in the temperature-compensation mechanisms of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Genetics*, *170*(1), 387–400. doi:10.1534/genetics.104.035238
- Fankhauser, C., & Staiger, D. (2002). Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta*, *216*(1), 1–16. doi:10.1007/s00425-002-0831-4

- Farinas, B., & Mas, P. (2011). Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 66(2), 318–29. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04484.x
- Feng, X., Wilson, Y., Bowers, J., Kennaway, R., Bangham, A., Hannah, A., Coen, E., et al. (2009). Evolution of allometry in *Antirrhinum*. *The Plant cell*, 21(10), 2999–3007. doi:10.1105/tpc.109.069054
- Fornara, F., Panigrahi, K. C. S., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Ruhl, M., Jarillo, J. a, Coupland, G., et al. (2009). *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental cell*, 17(1), 75–86. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.015
- Franklin, K. A., & Quail, P. H. (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of experimental botany*, 61(1), 11–24. doi:10.1093/jxb/erp304
- Fu, C., Yang, X. O., Chen, X., Chen, W., Ma, Y., Hu, J., & Li, S. (2009). OsEF3, a homologous gene of *Arabidopsis* ELF3, has pleiotropic effects in rice. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 11(5), 751–7. doi:10.1111/j.1438-8677.2008.00156.x
- Fujiwara, S., Wang, L., Han, L., Suh, S.-S., Salomé, P. A., McClung, C. R., & Somers, D. E. (2008). Post-translational regulation of the *Arabidopsis* circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins. *The Journal of biological chemistry*, 283(34), 23073–83. doi:10.1074/jbc.M803471200
- Ganeteg, U., Strand, Å., Gustafsson, P., & Jansson, S. (2001). The Properties of the Chlorophyll a / b-Binding Proteins Lhca2 and Lhca3 Studied in Vivo Using Antisense Inhibition 1, 127(September), 150–158.
- Gendron, J. M., Pruneda-Paz, J. L., Doherty, C. J., Gross, A. M., Kang, S. E., & Kay, S. A. (2012). *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 3167–72. doi:10.1073/pnas.1200355109
- Gould, P. D., Locke, J. C. W., Larue, C., Southern, M. M., Davis, S. J., Hanano, S., Moyle, R., et al. (2006). The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant cell*, 18(5), 1177–87. doi:10.1105/tpc.105.039990

- Griffiths, S., Dunford, R. P., Coupland, G., & Laurie, D. A. (2003). The evolution of CONSTANS-like gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *131*(4), 1855–1867. doi:Doi 10.1104/Pp.102.016188
- Gudin, S. (2010). Rose: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* (pp. 159–189).
- Guterman, I. (2002). Rose Scent: Genomics Approach to Discovering Novel Floral Fragrance-Related Genes. *THE PLANT CELL ONLINE*, *14*(10), 2325–2338. doi:10.1105/tpc.005207
- Guzmán, J., & Rodríguez, F. (2010). Laboratorio virtual para la enseñanza de control climático de invernaderos. ..., *2*, 82–92. Retrieved from <http://portal.chapingo.mx/revistas/revistas/articulos/doc/ecfc9c0a32c370f225f648c0f879da39.pdf>
- Hall, C.R., & Dickson, M. W. (2011). Economic, environmental, and health / well-being benefits associated with green industry products and services: a review. *Journal of Environmental Horticulture*, *29*, 96–103.
- Hall, Charles R, Hodges, A. W., & Haydu, J. J. (2006). & Marketing Reports The Economic Impact of the Green Industry in the United States, *16*(June), 345–353.
- Hammond, J., Hsu, H.-T., Huang, Q., Jordan, R., Kamo, K., & Pooler, M. (2006). Transgenic Approaches to Disease Resistance in Ornamental Crops. *Journal of Crop Improvement*, *17*(1-2), 155–210. doi:10.1300/J411v17n01_06
- Hardin, P. E., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, *343*, 536–540.
- Hayama, R., & Coupland, G. (2003). Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*(1), 13–19. doi:10.1016/S1369-5266(02)00011-0
- Hecht, V., Knowles, C. L., Vander Schoor, J. K., Liew, L. C., Jones, S. E., Lambert, M. J. M., & Weller, J. L. (2007). Pea LATE BLOOMER1 is a GIGANTEA ortholog with roles in photoperiodic flowering, deetiolation, and transcriptional regulation of circadian clock gene homologs. *Plant physiology*, *144*(2), 648–61. doi:10.1104/pp.107.096818

- Heddad, M., & Adamska, I. (2000). Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll a_b-binding gene family, 97(7).
- Helfer, A., Nusinow, D. A., Chow, B. Y., Gehrke, A. R., Bulyk, M. L., & Kay, S. A. (2011). LUX ARRHYTHMO encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the *Arabidopsis* core clock. *Current biology : CB*, 21(2), 126–33.
doi:10.1016/j.cub.2010.12.021
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), R19.
doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, 67, 425–79. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425
- Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S., & Lauvergeat, V. (2011). Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of experimental botany*, 62(8), 2465–83. doi:10.1093/jxb/erq442
- Hicks, K. A., Millar, A. J., Carre, I. A., Somers, D. E., Straume, M., Meeks-Wagner, D. R., & Kay, S. A. (1996). Conditional Circadian Dysfunction of the *Arabidopsis* early-flowering 3 Mutant. *Science*, 274(5288), 790–792. doi:10.1126/science.274.5288.790
- Holton, T. A., Brugliera, F., Lester, D. R., Tanaka, Y., Hyland, C. D., Menting, J. G., Lu, C. Y., et al. (1993). Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature*, 366(6452), 276–9. doi:10.1038/366276a0
- Hsiao, Y.-Y., Pan, Z.-J., Hsu, C.-C., Yang, Y.-P., Hsu, Y.-C., Chuang, Y.-C., Shih, H.-H., et al. (2011). Research on orchid biology and biotechnology. *Plant & cell physiology*, 52(9), 1467–86. doi:10.1093/pcp/pcr100
- Huang, W., Perez-Garcia, P., Pokhilko, A., Millar, a J., Antoshechkin, I., Riechmann, J. L., Mas, P., et al. (2012). Mapping the Core of the *Arabidopsis* Circadian Clock Defines the Network Structure of the Oscillator. *Science*, 336(6077), 75–79. doi:Doi 10.1126/Science.1219075

- Huang, W., Pérez-García, P., Pokhilko, A., Millar, A. J., Antoshechkin, I., Riechmann, J. L., & Mas, P. (2012). Mapping the core of the *Arabidopsis* circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6077), 75–9. doi:10.1126/science.1219075
- Imaizumi, T., Tran, H. G., Swartz, T. E., Briggs, W. R., & Kay, S. A. (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 426(6964), 302–6. doi:10.1038/nature02090
- Jarillo, J. A., & Piñeiro, M. A. (2006). The molecular basis of photoperiodism. *Biological Rhythm Research*, 37(4), 353–380. doi:10.1080/09291010600804619
- Jiao, Y., Lau, O. S., & Deng, X. W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature reviews. Genetics*, 8(3), 217–30. doi:10.1038/nrg2049
- Kamiishi, Y., Otani, M., Takagi, H., Han, D.-S., Mori, S., Tatsuzawa, F., Okuhara, H., et al. (2011). Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene. *Molecular Breeding*, 30(2), 671–680. doi:10.1007/s11032-011-9653-z
- Khanna, R., Kronmiller, B., Maszle, D. R., Coupland, G., Holm, M., Mizuno, T., & Wu, S.-H. (2009). The *Arabidopsis* B-box zinc finger family. *The Plant cell*, 21(11), 3416–20. doi:10.1105/tpc.109.069088
- Kim, W.-Y., Fujiwara, S., Suh, S.-S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., et al. (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*, 449(7160), 356–60. doi:10.1038/nature06132
- Kim, Y.-S., Lim, S., Kang, K.-K., Jung, Y.-J., Lee, Y.-H., Choi, Y.-E., & Sano, H. (2011). Resistance against beet armyworms and cotton aphids in caffeine-producing transgenic chrysanthemum. *Plant Biotechnology*, 28(4), 393–395. doi:10.5511/plantbiotechnology.11.0510a
- Kolmos, E., Schoof, H., Plümer, M., & Davis, S. J. (2008). Structural insights into the function of the core-circadian factor TIMING OF CAB2 EXPRESSION 1 (TOC1). *Journal of circadian rhythms*, 6, 3. doi:10.1186/1740-3391-6-3

Langlade, N. B., Feng, X., Dransfield, T., Copsey, L., Hanna, A. I., Thébaud, C., Bangham, A., et al. (2005). Evolution through genetically controlled allometry space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29), 10221–6. doi:10.1073/pnas.0504210102

Ledger, S., Strayer, C., Ashton, F., Kay, S. A., & Putterill, J. (2001). Analysis of the function of two circadian-regulated CONSTANS-LIKE genes. *The Plant Journal*, 26(1), 15–22. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01003.x

Lee, J., & Lee, I. (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of experimental botany*, 61(9), 2247–54. doi:10.1093/jxb/erq098

Li, X., Gasic, K., Cammue, B., Broekaert, W., & Korban, S. S. (2003). Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, Ace-AMP1, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*). *Planta*, 218(2), 226–32. doi:10.1007/s00425-003-1093-5

Liao, L.-J., Pan, I.-C., Chan, Y.-L., Hsu, Y.-H., Chen, W.-H., & Chan, M.-T. (2004). Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of Cymbidium Mosaic Virus is a manifestation of RNA-mediated resistance. *Molecular Breeding*, 13(3), 229–242. doi:10.1023/B:MOLB.0000022527.68551.30

Lifschitz, E., & Eshed, Y. (2006). Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of experimental botany*, 57(13), 3405–14. doi:10.1093/jxb/erl106

Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Shalit, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvarez, J. P., et al. (2006). The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6398–403. doi:10.1073/pnas.0601620103

Linneo, C. (1753). *Species Plantarum*, 2, 617.

- Liu, X. L., Covington, M. F., Fankhauser, C., Chory, J., & Wagner, D. R. (2001). ELF3 encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway. *The Plant cell*, *13*(6), 1293–304. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=135570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mallona, I., Lischewski, S., Weiss, J., Hause, B., & Egea-Cortines, M. (2010). Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC plant biology*, *10*, 4. doi:10.1186/1471-2229-10-4
- Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M. J., Weiss, J., & Egea-Cortines, M. (2012). Quantitative levels of *Deficiens* and *Globosa* during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *72*(2), 294–307. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05080.x
- Mas, P. (2002). Dual Role of TOC1 in the Control of Circadian and Photomorphogenic Responses in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE*, *15*(1), 223–236. doi:10.1105/tpc.006734
- Más, P., Kim, W.-Y., Somers, D. E., & Kay, S. A. (2003). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, *426*(6966), 567–70. doi:10.1038/nature02163
- McClung, C R. (2011). The genetics of plant clocks. *Advances in Genetics*, *74*, 105–139.
- McClung, C.R. (2006). Plant circadian rhythms. *The Plant cell*, *18*(4), 792–803. doi:10.1105/tpc.106.040980
- McWatters, H. G., Bastow, R. M., Hall, A., & Millar, A. J. (2000). The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature*, *408*(6813), 716–20. doi:10.1038/35047079
- Melchers, G. (1939). Genetik und Evolution. *Z. f. indukt. Abst.- u. Vererbungsl.*, *76*, 229–256.

- Millar, A. J., & Kay, S. A. (1996). Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), 15491–6.
Retrieved from
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Monselise, S., & Goldschmidt, E. (1982). Alternate bearing in fruit trees. *Horticultural Review*, 128–173.
- Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M. C., Primo-Millo, E., Agustí, M., & Iglesias, D. J. (2011). Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing “Moncada” mandarin. *Annals of botany*, 108(3), 511–9.
doi:10.1093/aob/mcr164
- Nakamichi, N., Kusano, M., Fukushima, A., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., Saito, K., et al. (2009). Transcript profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant & cell physiology*, 50(3), 447–62. doi:10.1093/pcp/pcp004
- Nakamura, N., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Ishiguro, K., Suzuki, K., Suzuki, H., Okazaki, K., et al. (2010). Generation of pink flower varieties from blue *Torenia hybrida* by redirecting the flavonoid biosynthetic pathway from delphinidin to pelargonidin. *Plant Biotechnology*, 27(5), 375–383. doi:10.5511/plantbiotechnology.10.0610a
- Nakatsuka, T., Mishiba, K., Kubota, A., Abe, Y., Yamamura, S., Nakamura, N., Tanaka, Y., et al. (2010). Genetic engineering of novel flower colour by suppression of anthocyanin modification genes in gentian. *Journal of plant physiology*, 167(3), 231–7.
doi:10.1016/j.jplph.2009.08.007
- Nakatsuka, T., Saito, M., Yamada, E., & Nishihara, M. (2011). Production of picotee-type flowers in Japanese gentian by CRES-T. *Plant Biotechnology*, 28(2), 173–180.
doi:10.5511/plantbiotechnology.10.1101b
- Nishihara, M., & Nakatsuka, T. (2011). Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology letters*, 33(3), 433–41.
doi:10.1007/s10529-010-0461-z

- Nusinow, D. A., Helfer, A., Hamilton, E. E., King, J. J., Imaizumi, T., Schultz, T. F., Farré, E. M., et al. (2011). The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, 475(7356), 398–402. doi:10.1038/nature10182
- Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., et al. (2006). Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(29), 11075–80. doi:10.1073/pnas.0604246103
- Panda, S., Hogenesch, J. B., & Kay, S. A. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417(6886), 329–335. doi:10.1038/417329a 417329a [pii]
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=113859&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Piechulla, B., Kellmann, J. W., Pichersky, E., Schwartz, E., & Forster, H. H. (1991). Determination of Steady-State Messenger-Rna Levels of Individual Chlorophyll a/B Binding-Protein Genes of the Tomato Cab Gene Family. *Molecular & General Genetics*, 230(3), 413–422.
- Pittendrigh, C. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 40(1018-1029).
- Pokhilko, A., Fernández, A. P., Edwards, K. D., Southern, M. M., Halliday, K. J., & Millar, A. J. (2012). The clock gene circuit in *Arabidopsis* includes a repressilator with additional feedback loops. *Molecular systems biology*, 8, 574. doi:10.1038/msb.2012.6
- Potera, C. (2007). Blooming biotech. *Nature biotechnology*, 25(9), 963–5. doi:10.1038/nbt0907-963
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., & Coupland, G. (1995). The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80(6), 847–857. doi:10.1016/0092-8674(95)90288-0

- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491. doi:10.1126/science.2448875
- Saito, H., Ogiso-Tanaka, E., Okumoto, Y., Yoshitake, Y., Izumi, H., Yokoo, T., Matsubara, K., et al. (2012). Ef7 encodes an ELF3-like protein and promotes rice flowering by negatively regulating the floral repressor gene Ghd7 under both short- and long-day conditions. *Plant & cell physiology*, 53(4), 717–28. doi:10.1093/pcp/pcs029
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18343690>
- Salomé, P. A., Weigel, D., & McClung, C. R. (2010). The role of the *Arabidopsis* morning loop components CCA1, LHY, PRR7, and PRR9 in temperature compensation. *The Plant cell*, 22(11), 3650–61. doi:10.1105/tpc.110.079087
- Samach, A. (2000). Distinct Roles of CONSTANS Target Genes in Reproductive Development of *Arabidopsis*. *Science*, 288(5471), 1613–1616. doi:10.1126/science.288.5471.1613
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F., & Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*, 288(5471), 1613–1616. doi:10.1126/science.288.5471.1613
- Sandmann, G., Römer, S., & Fraser, P. D. (2006). Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic engineering*, 8(4), 291–302. doi:10.1016/j.ymben.2006.01.005
- Saxena, G., Banerjee, S., Verma, P. C., Mallavarapu, G. R., & Kumar, S. (2007). Rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) generated by *Agrobacterium rhizogenes* mediated Ri-insertion for improved essential oil quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(2), 215–223. doi:10.1007/s11240-007-9261-0
- Schick, R. (1934). Über einige, für den Pflanzenzüchter interessante Mutanten von *Antirrhinum majus*. *Züchter*, 6, 30–33.

- Schick, R., & Stubbe, H. (1934). Die Gene von *Antirrhinum majus*. III. Z. f. indukt. Abst.- u. Vererbungslehre, 66(425-462).
- Schwarz-Sommer, Z., Davies, B., & Hudson, A. (2003). The Snapdragon: a valid model plant. *Max Planck Research*, 4, 52–54.
- Schwarz-Sommer, Z., Gübitz, T., Weiss, J., Gómez-di-Marco, P., Delgado-Benarroch, L., Hudson, A., & Egea-Cortines, M. (2010). A molecular recombination map of *Antirrhinum majus*. *BMC plant biology*, 10(1), 275. doi:10.1186/1471-2229-10-275
- Serrano, G., Herrera-Palau, R., Romero, J. M., Serrano, A., Coupland, G., & Valverde, F. (2009). Chlamydomonas CONSTANS and the Evolution of Plant Photoperiodic Signaling. *Current Biology*, 19(5), 359–368. Retrieved from <Go to ISI>://000264171100023
- Shibata, M. (2008). Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding. *Plant Biotechnology*, 25(1), 3–8. doi:10.5511/plantbiotechnology.25.3
- Simpson, G. G., Gendall, A. R., & Dean, C. (1999). When to switch to flowering. *Annual review of cell and developmental biology*, 15, 519–50. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.519
- Somers, D., Webb, A., Pearson, M., & Kay, S. (1998). The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/125/3/485.short>
- Spitzer-Rimon, B., Marhevka, E., Barkai, O., Marton, I., Edelbaum, O., Masci, T., Prathapani, N.-K., et al. (2010). EOBII, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia. *The Plant cell*, 22(6), 1961–76. doi:10.1105/tpc.109.067280
- Strayer, C. (2000). Cloning of the *Arabidopsis* Clock Gene TOC1, an Autoregulatory Response Regulator Homolog. *Science*, 289(5480), 768–771. doi:10.1126/science.289.5480.768
- Stubbe, H. (1933). Labile Gene. *Bibliographia Genetica*, 299–356.

- Stubbe, H. (1966). *Genetik und Zytologie von Antirrhinum L. sect. Antirrhinum* (VEB Gustav.).
- Stubbe, H. (1974). New mutants of *Antirrhinum majus*. *Kultupflanze*, 22, 189–213.
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. (2001a). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, 410(6832), 1116–20. doi:10.1038/35074138
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. (2001b). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, 410(6832), 1116–20. doi:10.1038/35074138
- Suzuki, S., Nishihara, M., Nakatsuka, T., Misawa, N., Ogiwara, I., & Yamamura, S. (2007). Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant cell reports*, 26(7), 951–9. doi:10.1007/s00299-006-0302-7
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (Universita.).
- Takata, N., Saito, S., Saito, C. T., & Uemura, M. (2010). Phylogenetic footprint of the plant clock system in angiosperms: evolutionary processes of pseudo-response regulators. *BMC evolutionary biology*, 10, 126. doi:10.1186/1471-2148-10-126
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H. L., Yokoi, S., & Shimamoto, K. (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5827), 1033–6. doi:10.1126/science.1141753
- Tanaka, Y., Brugliera, F., Kalc, G., Senior, M., Dyson, B., Nakamura, N., Katsumoto, Y., et al. (2010). Flower Color Modification by Engineering of the Flavonoid Biosynthetic Pathway: Practical Perspectives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(9), 1760–1769. doi:10.1271/bbb.100358
- Teixeira da Silva, J. A., Chin, D. P., Van, P. T., & Mii, M. (2011). Transgenic orchids. *Scientia Horticulturae*, 130(4), 673–680.
- Thomé, O. W. (1885). *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*.

- Togami, J., Okuhara, H., Nakamura, N., Ishiguro, K., Hirose, C., Ochiai, M., Fukui, Y., et al. (2011). Isolation of cDNAs encoding tetrahydroxychalcone 2'-glucosyltransferase activity from carnation, cyclamen, and catharanthus. *Plant Biotechnology*, 28(2), 231–238. doi:10.5511/plantbiotechnology.11.0106b
- Tränkner, C., Lehmann, S., Hoenicka, H., Hanke, M.-V., Fladung, M., Lenhardt, D., Dunemann, F., et al. (2010). Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta*, 232(6), 1309–24. doi:10.1007/s00425-010-1254-2
- Tsuji, H., Taoka, K., & Shimamoto, K. (2011). Regulation of flowering in rice: two florigen genes, a complex gene network, and natural variation. *Current opinion in plant biology*, 14(1), 45–52. doi:10.1016/j.pbi.2010.08.016
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), RESEARCH0034. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126239&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vilmorin. (1896). Vilmorin's, Blumengärtnerei. Bd.1 *Antirrhinum majus*, S.756. Berlin: Paul Parey.
- Wang, Z. Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M. S., & Tobin, E. M. (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* Lhcb gene. *The Plant cell*, 9(4), 491–507. doi:10.1105/tpc.9.4.491
- Warner, R. (2011). Genetic approaches to improve cold tolerance of petunia. *Floriculture International*, June, 15–16.
- Watanabe, S., Xia, Z., Hideshima, R., Tsubokura, Y., Sato, S., Yamanaka, N., Takahashi, R., et al. (2011). A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the GIGANTEA gene is involved in soybean maturity and flowering. *Genetics*, 188(2), 395–407. doi:10.1534/genetics.110.125062
- Watson, J. D., Losick, R., Baker, T. A., Bell, S., Gann, A., & Levine, M. W. (2008). *Molecular biology of the gene* (p. 841). Benjamin Cummings.

Xue, W., Xing, Y., Weng, X., Zhao, Y., Tang, W., Wang, L., Zhou, H., et al. (2008). Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nature genetics*, 40(6), 761–7. doi:10.1038/ng.143