



Universidad
Politécnica
de Cartagena



Máster Universitario en
Técnicas Avanzadas en Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario

Análisis fenotípico de una población segregante de
líneas de silenciamiento génico del gen LHY en
Antirrhinum.majus

Jaime Molina Ballesteros

Marcos Egea-Cortines
Julia Weiss Rosl

Cartagena, 30 de Septiembre 2014

1. RESUMEN

El porque de cómo están implicados los fenómenos de regulación molecular en la expresión génica de la floración y crecimiento en plantas, se deben no solo a la interacción de fenómenos ambientales sino también a una batería de genes que sirven de punto de entrada de dichas señales ambientales. El sistema de entrada de señales de luz y temperatura se produce a través del reloj circadiano. En plantas superiores, el reloj circadiano se conoce con más detalle en *Arabidopsis*. Se compone de una serie de genes cuya expresión coincide con la mañana, mediodía y la noche. En base a su expresión y a las interacciones de activación y represión entre ellos, se conocen como bucle de la mañana, formado por los genes PSEUDORESPONSE REGULATOR 9, 7, 5 Y 3, bucle del mediodía formado en *Arabidopsis* por los parálogos LATE ELONGATED HYPOCOTYL y CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1, y el bucle de la noche formado por los genes TIMING OF CAB1, ZEITLUPE, EARLY FLOWERING 3 Y 4 y GIGANTEA. Esta batería de genes y dicha interacción producen una respuesta más eficiente en términos cuantitativos y cualitativos de los procesos biológicos. Entre los mecanismos que operan destaca por su importancia el llamado reloj circadiano. El llamado núcleo central del reloj está repartido en tres bucles. Las señales externas llegan al oscilador que a su vez genera una modulación del ARNm activando una adecuada vía de salida dependiendo de la hora del día y del estímulo específico. Los mecanismos de control no tiene porque ser lineales, sino que se producen interacciones mediante procesos de retroalimentación positiva y negativa. Dicho mecanismo de control se denomina gating que controla la temporalidad de las vías de salida dependiendo de las horas del día. Teniendo en cuenta todo esto, se ha desarrollado líneas transgénicas para obtener silenciamiento génico del gen LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), gen del bucle del medio día del reloj circadiano de *Antirrhinum majus*. En el presente proyecto que presento, he llevado a cabo un estudio de líneas de AmRNAi::LHY para determinar su efecto fenotípico con respecto al silvestre. Los resultados obtenidos permiten constatar que el nivel de expresión génica de la línea transgénica 14 con respecto a plantas hermanas no transgénicas es significativamente menor. Además en el análisis de parámetros vegetativos y florales muestras diferencias significativas en la longitud total del tallo en aquellas plantas que contienen la construcción génica (silenciamiento génico), siendo estas más cortas que las silvestres. La línea 27 muestra un fenotipo de disminución del tamaño de la flor en las plantas positivas con respecto a las silvestres. Los resultados obtenidos permiten concluir de forma preliminar que AmLHY podría tener un efecto sobre el crecimiento vegetativo y reproductivo en *A.majus*.

2. PALABRAS CLAVE:

Reloj circadiano; *Antirrhinum majus*; Gen LHY; Silenciamiento génico.

3. ABSTRACT

The way plants interact with the environment is governed by the selective detection of environmental cues through a complex set of receptors. The plant circadian clock integrates light and temperature signals. The genes that form the circadian clock in

higher plants are known in Arabidopsis. It comprises a set of genes that show expression patterns according to certain day times. According to their expression and molecular interactions they are classified as morning, midday and evening loops. The morning loop is formed by PSEUDORESPONSE REGULATOR 9, 7, 5 and 3, the midday loop comprises two paralogs in Arabidopsis: LATE ELONGATED HYPOCOTYL and CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1. The evening loop is integrated by TIMING OF CAB1, ZEITLUPE, EARLY FLOWERING 3, 4 and GIGANTEA. Control mechanisms have not have to be linear, but interactions occur through processes of positive and negative feedback. This mechanism is called gating control that controls the timing of exit routes depending on the time of day. The aim of the current Project was to analyze transgenic lines for gene silencing of LATE ELONGATED hypocotyl (LHY) in *Antirrhinum majus*. The obtained results allow to state that the line 14 shows no significant difference in the overall length of the stem at those plants containing the construct and are shorter. Line 27 shows a phenotype of decreased flower size in the positive plants. The results obtained indicate preliminarily that AmLHY could have an effect on vegetative and reproductive growth in *Antirrhinum majus*.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Generalidades de los organismos vegetales

En un ambiente donde las condiciones climáticas son tremendamente diversas, los organismos vegetales han evolucionado hacia un fenómeno de interrelación pura con el medio, donde realizan tanto sus funciones fisiológicas como reproductivas. Para ello han tenido que establecer estrategias como son la captación de las señales externas, para después integrarlas, regularlas y controlarlas con eficientes mecanismos genéticos y metabólicos, los cuales dan respuestas a través de finísimos mecanismos conocidos con el nombre de retroalimentación positiva y negativa. Éstos desencadenan una serie de respuestas encaminadas a que el organismo vegetal cumpla con sus cometidos tanto fisiológicos como reproductivos en la naturaleza.

4.2 ¿Cómo se produce el crecimiento en los organismos vegetales?

Una vez discutido el fenómeno de interrelación entre el binomio medio-organismo vegetal, se plantea la siguiente pregunta: ¿Cómo los organismos vegetales crecen en el medio que les rodea? Para responder a esta cuestión, los organismos vegetales alternan durante todas las etapas de su vida, donde continuamente se están diferenciando raíces, tallos, hojas y frutos, mediante la intervención de factores internos como son las fitohormonas, cuya finalidad es producir el desarrollo del organismo vegetal, al inducir respuestas fisiológicas específicas y rápidas en el seno del vegetal. Pimienta, Euglosio; Muñoz, Alejandro; Ramírez, Blanca C; Méndez, Lucila (2006).

Los organismos vegetales poseen un crecimiento modular, esto implica una repetición de módulos, cada módulo consiste en una hoja con una yema axilar y el punto donde se insertan las hojas se denomina nodos. Entre nodo y nodo hay un internodo. De esta forma, el crecimiento de las plantas consiste en la repetición de este patrón y en la expresión de las yemas axilares en apéndices reproductivos (flores) o vegetativos (ramas). El crecimiento en longitud y grosor se da gracias a la acción de los meristemos. El destino celular no depende del linaje celular sino que es determinada por la posición. Un ejemplo son las células epidérmicas de las raíces que se derivan de un pequeño grupo de células madre en la capa L1. Sin embargo, los derivados de la capa L1 están comprometidos a ser células epidérmicas debido a que se encuentran posicionadas en la parte superior de la capa celular cortical y no porque se derivan clonalmente de las células madre en la capa L1, Scheres, Bernard (2001). El plano en el cual una célula se divide determinará la posición de la célula hija dentro de un tejido y esta posición determinará el destino de esta célula. La más fuerte evidencia que se tiene de la importancia de la posición, consiste en experimentos realizados en los cuales se examina el destino de células que son desplazadas de su posición normal a otra, Taiz, Lincoln; Zeiger, Eduardo (2007).

4.3 Señales externas que desencadenan las respuestas celulares

Las señales externas que estimulan a los organismos vegetales son captadas por receptores, la interacción entre la hormona y el receptor genera una reacción en cadena como la activación o desactivación de proteínas de la membrana celular, el movimiento de iones mediante el transporte específico de proteínas, cambios en el potencial de membrana y el pH tanto en el medio interno como externo. Todos estos procesos configuran una

intensa red de mensajes secundarios que amplifican la señal recibida provocando una respuesta celular concreta.

4.4 El reloj circadiano reloj y su estructura

Actualmente el reloj circadiano se puede definir como una intensa red de genes que tienen un comportamiento finísimo que permiten el ajuste de funciones biológicas como el mantenimiento de los órganos fotosintéticos, la emisión de volátiles o el momento de polinización, frente a los cambios ambientales. Otra de las características del reloj es la anticipación a esos cambios, dirigiendo procesos morfogénicos como el letargo invernal o la adaptación a frío o calor en las diferentes estaciones. La precisión de este sistema proporciona a la planta un funcionamiento adecuado que se expresa en una correcta generación de salidas u outputs (Egea-Cortines et al., 2012). Además el reloj puede llevar a cabo al menos dos niveles de interacción. Un nivel transcripcional, donde la activación y la represión de la expresión de un gen, juega un papel principal y un segundo nivel de regulación postranscripcional en el que las proteínas forman complejos que son selectivamente degradadas o modificados por fosforilación.

Para poder comprender como tiene lugar toda esta intensa red de intercomunicación entre unas células y otras, los organismos vegetales disponen de un sofisticado mecanismo basal a nivel genético que mantiene la ritmicidad tanto en el mecanismo de control vegetativo como reproductivo. Este mecanismo consiste en la conexión del oscilador con las vías de entrada y salida para producir un fenómeno de intercomunicación mutua entre células, llevado a cabo por fenómenos de retroalimentación positiva y negativa. Dicho mecanismo basal llamado Reloj Circadiano, consiste en una serie de bucles (oscilador), que posee dos factores de transcripción MYB (CCA1 y LHY), (Nakamichi et al., 2010), que actúan de forma redundante para reprimir la expresión de TOC1 mediante su unión con el promotor de TOC1, ocurriendo durante el fenómeno de transcripción de la mañana, (Gendron et al., 2012). A medida que avanza el día la expresión de CCA1 y LHY disminuye y aumenta la expresión de TOC1 a continuación se cierra el bucle y con ello los genes LHY y CCA1. Modelos matemáticos han incorporado componentes desconocidos (CHE), que se unen al promotor del gen TOC1 conduciendo a la activación transcripcional de CCA1. El bucle verde implica la presencia de pseudo-reguladores de respuesta que tienen la capacidad de reprimir la transcripción de LHY y CCA1. El bucle azul de Y, implica una interacción entre los genes TOC1 y Y (Farinas and Mas, 2011), dicha interacción sea dilucidado gracias a la utilización de modelos matemáticos y cuya existencia se explica por GI, este interactúa con ZTL inhibiendo la transcripción de TOC1. ZTL también actúa de forma redundante con sus homólogos para regular el ritmo del reloj circadiano. Todo este complejo proceso de interrelación génica conlleva en última estancia a la modulación de la expresión génica, mediante la expresión diferencial de determinados factores de transcripción.

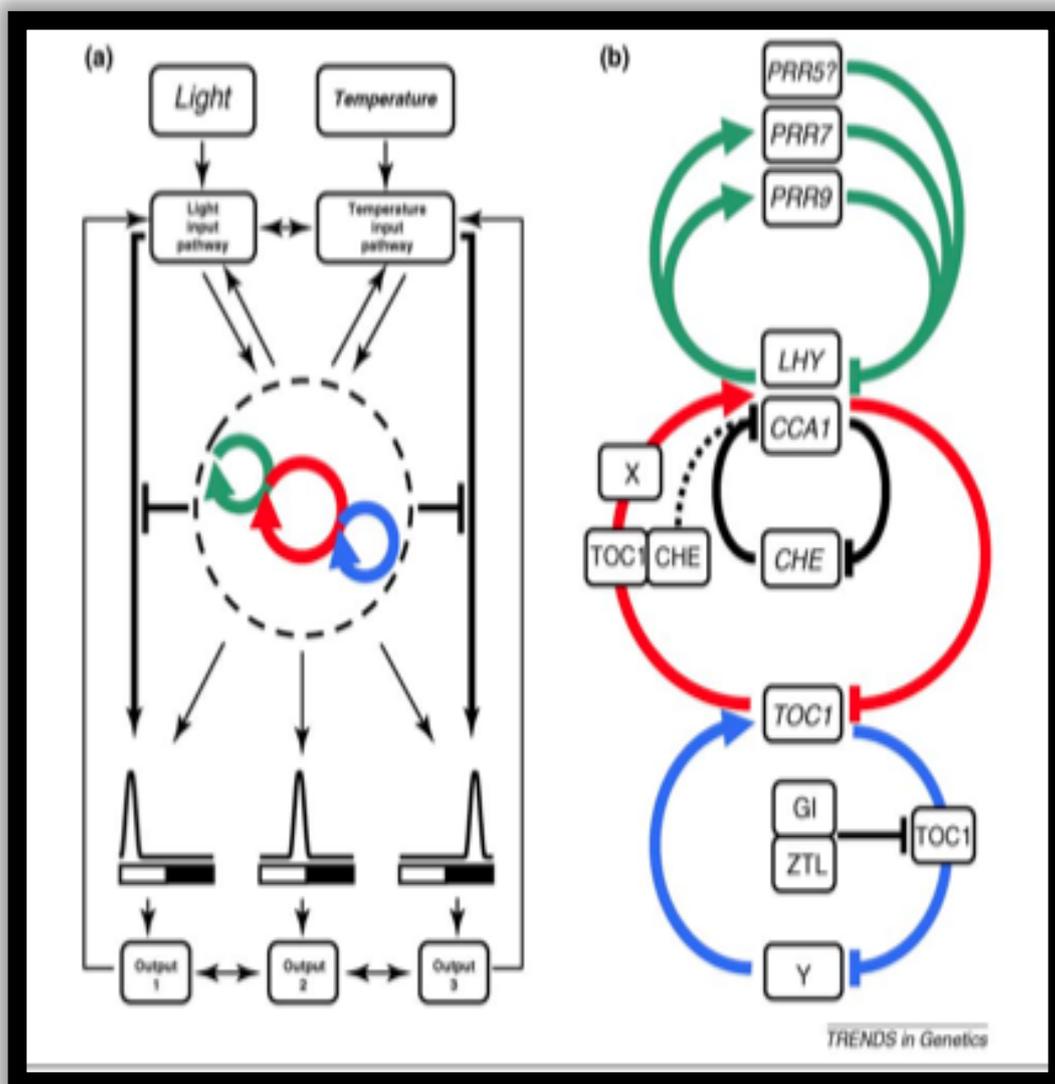


Figura 1 Representación esquemática del reloj circadiano de *Arabidopsis thaliana*. Las flechas muestran el flujo de transmisión de señales entre las diferentes partes del reloj. Los bucles de colores representan al núcleo oscilador del reloj. El momento del día está indicado con los rectángulos y negros de la parte inferior de la figura. La zona blanca corresponde a periodos de luz mientras que la zona negra del rectángulo indica periodos de oscuridad (Montaigu, Tóth, & Coupland, 2010).

4.5 Transformación génica de las plantas

La transformación genética es la alteración genética de una célula, que resulta de la introducción y expresión del material (ADN). El ARN también puede ser transferido en las células usando métodos similares, pero esto normalmente no provoca cambios heredables (Chen and Dubnau, 2003).

La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es la metodología de transformación vegetal más extendida. *A. tumefaciens* transfiere a las células de la planta un plásmido (ADN circular extra-cromosómico bacteriano) conocido como T-ADN. Éste se integra en alguna zona del genoma de la planta. Este plásmido, es el vehículo para las

operaciones de ingeniería genética. El tejido vegetal utilizado para la transformación, conocido como explanto, se sumerge durante un tiempo en una solución que contiene *Agrobacterium*; así, algunas células adyacentes al corte provocado para la generación de explantos serán transformadas por la bacteria, la cual inserta su ADN a la célula. Tras disponer los explantos en un medio inductor de tallos y raíces, permitirán que la planta crezca.

4.6 Silenciamiento de ADN genómico mediante ARN de interferencia (ARNi)

Uno de los mecanismos más potentes de obtención de alelos de pérdida de función es utilizando la maquinaria de silenciamiento post-transcripcional basada en ARN de interferencia o siRNA. Para poder obtener dichos alelos hay que obtener plantas transgénicas que expresen ARN de doble cadena (dsRNA), complementario al gen que se quiere silenciar, bien por transformación con un plásmido recombinante que produce dsRNA o con un plásmido recombinante que induce la transcripción de ARN de antisentido complementario ARN endógeno lo que provoca la producción de dsRNA. Una vez llevada a cabo la transformación e inducción del gen mediante el mecanismo de infección de una célula vegetal con *A. tumefaciens*, la planta reconoce el ARN de doble cadena producido por la construcción inducida en la planta a través del complejo enzimático DICER que posee dominios de ARNasa tipo III. El complejo DICER degrada moléculas de ARN para formar moléculas de ARN más pequeñas (Small interference RNAs o siRNAs de 21- 26 nucleótidos) (Gregory J. Hannon, 2002). Estos siRNA se unen al complejo con actividad nucleasa para formar el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), donde la actividad helicasa de RISC separa las dos hebras del siRNA y solo una de ellas permanece unida al complejo RISC. Una vez que este complejo está activado tiene como blanco la degradación de los ARN mensajeros homólogos a siRNAs de manera que se produce el silenciamiento (Gregory J. Hannon, 2002).

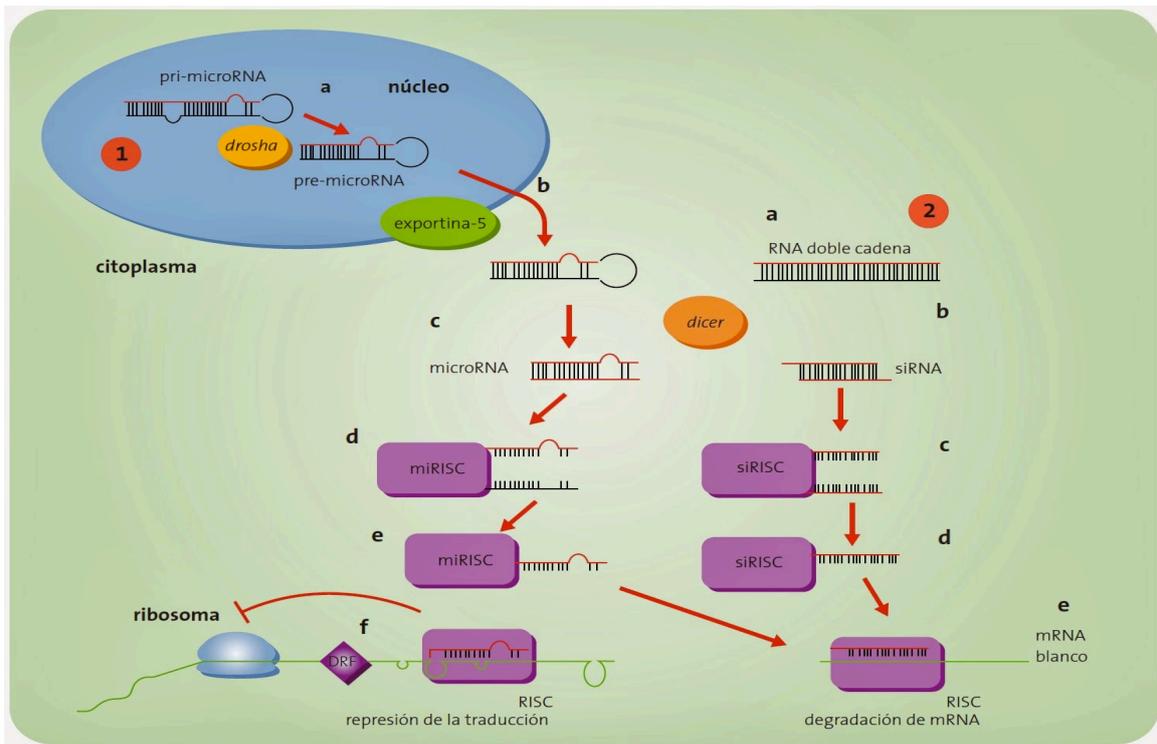


Figura 2. Vía del ARN de interferencia. Las dos vías de procesamiento se indican con los números 1 y 2. Los pasos de cada vía se señalan con letras. 1. Biogénesis de microARN: a) procesamiento por *droscha* en el núcleo, b) exportación de la molécula pre-microRNA del núcleo al citoplasma por exportina-5, c) segundo procesamiento por *dicer*, d) identificación y desnaturalización del microARN por miRISC, e) selección asimétrica de una de las cadenas del microARN, f) apareamiento con el mRNA blanco y represión de la traducción. 2. Biogénesis de los siARN: a) presencia de un RNA de doble cadena en el citoplasma, b) procesamiento por *dicer*, c) identificación del dúplex de 19 a 12 pares de bases por siRISC, d) selección asimétrica de una de las cadenas del dúplex, e) apareamiento con el ARNm blanco y subsiguiente degradación.

4.7 El mutante de *Antirrhinum majus*

El mutante nana (na) de *Antirrhinum majus* se caracteriza por un fenotipo complejo que incluye enanismo parcial, floración temprana independiente de fotoperiodo y germinación acelerada. Este fenotipo se ve acompañado con una ligera pero significativa resistencia a la inhibición de la germinación por paclobutrazol. Además otra característica muy interesante de su fenotipo semienano es que puede ser rescatado con un tratamiento con Giberelinas, concretamente GA3. Todo ello parecería indicar que nana afecta a la transducción de la señal o la síntesis de GAs al ser rescatado el fenotipo del tallo por el tratamiento. Sin embargo, los mutantes afectados en la síntesis de GAs, no florecen o lo hace muy tarde y tienen defectos patentes en los órganos florales (Wilson et al., 1992; Blazquez et al., 1998; Yu et al., 2004).

Trabajos desarrollados en el laboratorio consistentes en un estudio transcriptómico mostraron que muchos de los genes desregulados en nana, se corresponden con genes aguas abajo del reloj circadiano, indicando que los fenotipos mostrados podrían estar relacionados con un gen del reloj circadiano. El análisis de los genes *Am Timing of Chlorophyll a/b Binding-1* (*AmTOC1*) y *Am Chlorophyll a/b Binding Protein* (*AmCAB*) en experimentos circadianos, muestra que ambos genes se encuentran desregulados con un adelanto significativo en su expresión.

Existen varios mutantes de reloj circadiano en *Arabidopsis* que poseen fenotipos relacionados con el que encontramos en nana. El mutante *Early Flowering 3* (*ELF3*) fue identificado inicialmente como un gen involucrado en el tiempo de floración (Zagotta et al., 1992). Estudios posteriores identificaron a *ELF3* como un gen que forma parte del núcleo del reloj circadiano (McWatters et al., 2000) involucrado en la integración de la señal luminosa. El segundo par de genes que posee un fenotipo de floración temprana es *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) y el parólogo *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*). La pérdida de función de *CCA1* o *LHY* provoca floración temprana (Schaffer et al., 1998; Wang and Tobin, 1998). Además, dobles mutantes *cca1*, *lhy* muestran un interesante fenotipo de aceleración de la velocidad de la germinación (Gould et al., 2006), lo que podría indicar un posible alelismo de *CCA1* o *LHY* con nana.

4.8 El gen *Lhy*

Como se ha comentado anteriormente, son varios los genes conocidos por regular los ritmos circadianos en *Arabidopsis*, pero la identidad del oscilador central no se ha establecido. Los genes *LHY* y *CCA1* se relacionan con *MYB* como factores de transcripción estrechamente relacionados. La inactivación del gen *LHY* acorta el período de los ritmos circadianos en la expresión génica y los movimientos de las hojas. Mediante la construcción de dobles mutantes de *lhy* y *caa1-1*, se puede ver que *LHY* y *CCA1* son

parcialmente redundantes y esenciales para el mantenimiento de los ritmos circadianos con luz constante. En los ciclos de luz/oscuridad la *lhy caa1-1* de las plantas, muestran drásticas fases de expresión de GI y TOC1, genes que están asociados a la generación de los ritmos circadianos y la promoción de la expresión de LHY y CCA1. Con esto se puede pensar que LHY y CCA1 parecen ser elementos reguladores negativos requeridos para la función del oscilador central.

4.9 Objetivo y experimentos realizados para dilucidar dicho objetivo

El objetivo planteado es hacer un análisis fenotípico de la generación T1 de las líneas transgénicas 14 y 27, para poder determinar los genotipos de las líneas segregantes de 35S:ARNi LHY y poder dilucidar si existen diferencias significativas en el nivel de expresión génica entre las plantas silvestres y las transgénicas.

Para poder responder a esta cuestión he realizado:

- 1- Obtención de ADN de las plantas transgénicas (búsqueda del silenciamiento génico del gen LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY).
- 2- PCR, para obtener la amplificación del gen (LHY).
- 3- Electroforesis en gel de agarosa, para determinar el fragmento de 290 pb, de (LHY).
- 4- Determinar cuantitativamente parámetros vegetativos y florales.
- 5- Obtención de ARN de las plantas transgénicas (silenciamiento génico del gen LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY).
- 6- PCRcuantitativa, para determinar los valores de expresión génica de las plantas transgénicas con respecto a las silvestres.
- 7- Determinar si existen diferencias significativas en los niveles de expresión génica entre transgénicas y silvestres, mediante el programa REST 2008.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado es el vegetal *Antirrhinum.majus* del cual se han obtenido 2 líneas (línea 14 y 27), estas son transgénicas con respecto a las silvestres, ya que mediante la transformación con un vector de clonación constituido por un promotor constitutivo como es el 35S y la secuencia complementaria del gen LHY en su seno, para que se pueda complementar a su homólogo y producir en especie *Antirrhinum.majus* un silenciamiento al tener una construcción en horquilla específico de LHY. Una vez plantada la semilla de la especie objeto de estudio y realizado su ciclo, sean llevado a cabo una secuenciación de objetivos para determinar si hay diferencias significativas entre plantas silvestres y transgénicas comenzando por:

5.1 Obtención de ADN de las plantas transgénicas, (búsqueda del silenciamiento génico del gen *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*).

Para llevar a cabo la obtención de ADN he utilizado el siguiente protocolo: DNeasy Plant Mini®. Recogida de 100mg de peso fresco de hoja en doble decusado a la altura de la base de la inflorescencia de *Antirrhinum.majus*, de las líneas 14 y 27 depositándolas en un tubo de 1.5ml, a continuación se somete a un golpe de frío a las muestras con nitrógeno líquido para minimizar posibles daños celulares y se las introduce en un congelador a -80°C. Una vez congeladas se tritura las muestras utilizando un destructor de tejidos celulares con ayuda de pipetas y bolas de hierro para obtener una trituración del tejido más eficiente. Los tampones utilizados y sus cantidades son: 400µl del tampón AP1 y 4µl RNasa, 130µl de tampón AP2, 1.5 volúmenes del tampón AP3, 650µl de la mezcla, 500µl del tampón AW100µl de tampón AE, con estos se produce la lisis, deshidratación, lavado y elución de las membranas celulares junto con la eliminación del ARN. Las muestras deben ser sometidas a centrifugación para lograr la separación física de los órganos celulares por sedimentación. Las centrifugaciones empleadas en la separación celular son de 5 minutos a 14.000rpm para provocar una primera separación junto con centrifugaciones de 2 y 1 minuto a 8.000 y 6000rpm para las posteriores separaciones celulares. Además se utiliza las QIAshredder Mini spin column® que contiene un tubo de 2 ml para lograr que el ADN se adhiera a la membrana y de esta forma poder desechar los demás componentes celulares. Para lograr un óptimo periodo de incubación entre los diferentes pasos en la obtención del ADN se utiliza un horno para calentar las muestras durante 10 minutos a 65°C, hielo durante 5 minutos y temperatura ambiente.

Obtenido el ADN sea precipitado para obtener una concentración mayor. Para ello sea utilizado acetato de sodio y isopropanol como reactivos iniciales, después se hecha 100µl de alcohol al 70% y 25µl de tampón y se centrifuga durante 5 minutos.

Una vez obtenido el ADN, se somete a PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para lograr una amplificación del gen de interés que en este caso es (LHY). Los reactivos de la PCR son: 5µl de ADN, 5µl de tampón 5x, cebador 51 1µl, cebador 69 1µl, dNTP's 1µl, dimetil 0,5µl, polimerasa 0,5µl y agua 13,5µl con un volumen total por tubo de 20µl. La temperatura de los cebadores utilizados 51 y 69 es 55°C y la de 35S es de 54°C respectivamente. Además se utiliza plena y 165 como cebadores para el control positivo, estos cebador actúan a 58°C, como control negativo se utilizan tubos en los que están presentes todos los reactivos de la PCR menos los 5 µl de ADN. Una vez amplificado el gen de interés se utiliza la electroforesis en gel de agarosa. Los reactivos para preparar el gel son: 1g de agarosa, 100ml de tampón TAE, 7µl de Bromuro de etidio este último se

hecha una vez enfriada la mezcla de tampón TAE y agarosa. Antes de cargar las muestras en el gel de agarosa se prepara 10µl del contenido de los tubos de la PCR y 5µl de tampón de carga. El gel debe de estar inmerso en un solución tamponada (TAE). La electroforesis requiere una temperatura de 85°C durante el tiempo suficiente para que se separen claramente el fragmento de 290pb (transgen, LHY) en el que y se pueda visualizar en un sistema de imagen de geles GELEFLASH®.

5.2 Determinación cuantitativa de parámetros vegetativos y florales.

Sean determinado tanto parámetros vegetativos como florales para determinar sí el silenciamiento génico provocado en el gen LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), ha dado lugar a un cambio en la expresión fenotípica de *Antirrhinum.majus*. El material utilizado para realizar dichas medidas son un calibre y un metro y la medida escogida es el centímetro.

Los parámetros vegetativos son:

Altura total

Número de hojas en doble decusado

Altura hasta la inflorescencia

Los parámetros florales son:

Longitud del tubo

Longitud inferior

Altura del pétalo

Longitud del sépalo

Anchura del tubo

Longitud superior total

Expansión superior del pétalo

Expansión inferior del pétalo

Longitud del estambre

Longitud del gineceo y Pallate

5.3 Obtención de ARN de plantas transgénicas, (silenciamiento génico del gen LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)).

Con la obtención de ARN y su posterior transformación a ADNc, se logrará realizar una PCRcuantitativa, para poder dilucidar la expresión génica en términos de ARNm de la planta transgénica con respecto a la silvestre.

Para la obtención de ARN se utiliza el protocolo NucleoSpin ®ARN Plant.

Recogida de 100mg de peso fresco de hoja en doble decusado a la altura de la base de la inflorescencia de *Antirrhinum.majus*, de las líneas 14 y 27 depositándolas en un tubo de 1.5ml, a continuación se somete a un golpe de frío a las muestras con nitrógeno líquido para minimizar posibles daños celulares y se las introduce en un congelador a -80°C. Una vez congeladas se tritura las muestras utilizando un destructor de tejidos celulares con ayuda de pipetas y bolas de hierro para obtener una trituración del tejido más eficiente. Los tampones utilizados y sus cantidades son: 350µl del tampón RA1 y 3,5µl β-mercaptoethanol, 350µl 70% ethanol, 350µl de MDB, 95µl de DNase, 200µl de RAW2, 600µl DE RA3, 250µl de RA3 y 60µl de RNase-libre de agua, con estos reactivos se produce la lisis, deshidratación, lavado y elución de las membranas celulares junto con la digestión de ADN. Las muestras deben ser sometidas a centrifugación para lograr la

separación física de los órganos celulares por sedimentación. Las centrifugaciones empleadas en la separación celular son tres centrifugaciones de 1 minuto a 11.000rpm, dos centrifugaciones de 30 segundos a 11.000rpm y una centrifugación de dos minutos a 11.000rpm. Además se utiliza las NucleoSpin® filter que contiene un tubo de 2 ml para lograr que el ARN se adhiera a la membrana y de esta forma poder filtrar los demás componentes celulares. Para lograr un óptimo periodo de incubación entre los diferentes pasos en la obtención del ARN se somete este a la temperatura del laboratorio durante quince minutos, una vez obtenido el ARN se guarda en frigorífico a -80°C.

El ARN extraído se convierte en ADNc, mediante el protocolo Thermo Scientific Maxima First Strand ADNc Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase. Se requiere 8µl de ARN, 1 µl de 10x dsDNase, 1 µl de dsDNase, dando lugar a un volumen total de 10µl, 4µl de Reaction Mix, 2µl de Maxima Enzyme mix y 4µl de agua libre de nucleasa. Se realizan dos centrifugaciones de la mezcla de 1 minuto a 1000rpm cada una. Para incubar las muestras se someten a un termociclador con las siguientes temperaturas y tiempos, 2 minutos a 37°C, 10 minutos a 25°C, 15 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C. Una vez obtenido el ADNc, se somete a PCRcuantitativa para determinar los niveles de expresión génica en tiempo real. Los reactivos de la PCRcuantitativa son: en primer lugar se escoge el método, en este caso se realiza por SYBR™ Premix Ex Taq®, los primer escogidos son, Ubiquitina, Lhy y Cab, se preparan 3 máster Mix para suministrar los componentes a todos y cada uno de los pocillos de la placa. Los reactivos que componen las Máster Mix de Ubiquitina son, 10µl de SYBR, 0,4µl del primer Ubiquitina (revers), 0,4µl de Ubiquitina (forwars), 0,4µl de Rox, 6,8µl de agua, y 2µl de ADNc y 13,5µl de agua. Los reactivos que componen la Máster Mix de Lhy son, 10µl de SYBR, 0,4µl del primer Lhy (revers), 0,4µl de Lhy (forwars), 0,4µl de Rox, 6,8µl de agua, y 2µl de ADNc y 13,5µl de agua. Los reactivos que componen la Máster Mix de Cab son, 10µl de SYBR, 0,4µl del primer Cab (revers), 0,4µl de Cab (forwars), 0,4µl de Rox, 6,8µl de agua, y 2µl de ADNc y 13,5µl de agua. Los controles negativos los integran en este caso 3 pocillos con todos los reactivos de los demás pocillos menos el ADNc. En el ensayo debe de realizarse una réplica por cada muestra que se analice. Una vez pipeteados todos los pocillos, las muestras se someten a una centrifugación de 1 minuto de duración a 1000rpm. A continuación se sementé a q-PCR y los datos son analizados por el programa MxPro-Mx3000P. Por último se determinan si existen diferencias significativas en los niveles de expresión génica (análisis transcriptómico), entre plantas transgénicas y silvestres, mediante el programa REST 2008.

5.4 Análisis estadístico:

Los datos obtenidos por las mediciones realizadas en la cuantificación de los parámetros vegetativos y florales, sean analizado mediante el programa estadístico R. Para determinar si se observan diferencias significativas entre las plantas transgénicas y silvestres en cuanto a su nivel de expresión génica, se ha establecido la varianza de las medias de cada uno de las sumatorias de los parámetros cuantificables procedentes de las líneas 14 y 27 con un nivel de significación del 0,05, utilizando un test de Student con el programa R. Para obtener el análisis transcriptómico de los niveles de expresión génica en las líneas transgénicas 14 y 27, sea utilizado una qPCR, con el programa MxPro-Mx3000P. Con posterioridad el programa R a procesado y analizando los datos para obtener los niveles de eficiencia y takeoff. Por último los datos obtenidos en el programa MxPro-Mx3000P referentes a la eficiencia y el takeoff de la qPCR, se someten a un análisis con el

programa REST (Relative Expression Software Tool, versión 2008, para comprobar si existen diferencias en los niveles de expresión génica (ARNm) de las plantas transgénicas con respecto a las silvestres.

6. RESULTADOS

6.1 Electroforesis en gel de agarosa, del silenciamiento del gen *Lhy*

A la vista de los resultados de la imagen por electroforesis en gel de agarosa, se puede distinguir que tanto en las líneas analizadas 27 y 14, las cuales son transgénicas para el gen LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), poseen el gen (LHY) de 290pb objeto de estudio. En concreto las positivas en la línea 27 son (27.1, 27.2, 27.3, 27.7, 27.8, 27.9, 27.14, 27.15 y 27.27), estas han sido tratadas tanto con el cebador 35S como con Plena. Para la línea 14 han dado positivas (14.3, 14.4, 14.5, 14.7, 14.12, 14*, 14** y 14.21). Para el control positivo se a utilizado el cebador Plena, ya que esta demostrado su presencia y eficiencia a la hora de integrarse con el gen (LHY) en *Antirrhinum.major*, en el control negativo se aplica todos los reactivos menos el ADN, para comprobar que el ADN es el causante del resultado positivo en la técnica.

35S y Plena en la T1 de la línea T0-27

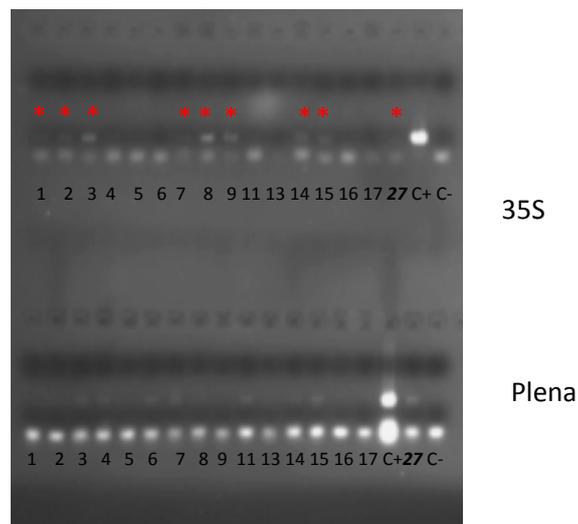


Imagen 1, gel de agarosa en la T1 de la línea transgénica 27, donde se muestra el gen *Lhy* de 290pb, utilizando los promotores 35S y Plena. Utilizando como control positivo ubiquitina y como control negativo todos los reactivos menos el ADN.

35S y Plena en la T1 de la línea T0-14

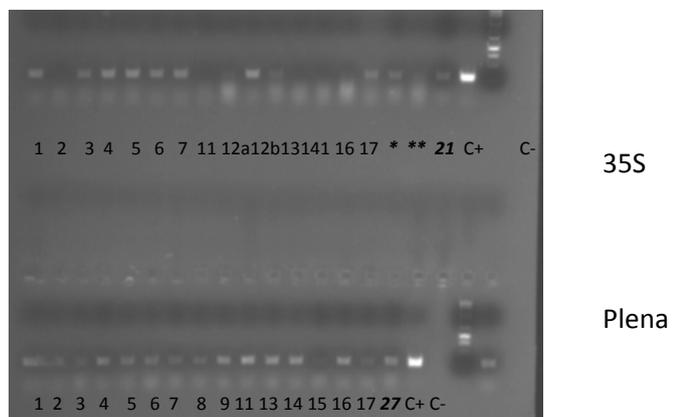


Imagen 2, gel de agarosa en la T1 de la línea transgénica 14 , donde se muestra el gen Lhy de 290pb, utilizando como promotores 35S y Plena. Control positivo Ubiquitina y control negativo todos los reactivos menos el ADN.

6.2 *Parámetros vegetativos y florales de las líneas transgénicas 14 y 27*

Parámetros vegetativos	Positiva	Negativa	Valor-P
Altura total	57,50±20,35	83,18±11,54	0.025
Nº de hojas en doble decusado	9,50±5,00	9,36±2,15	0.951
Altura hasta la inflorescencia	46,00±3,53	54,90±5,26	0.002
Distancia entrenudo1	4,12±1,31	4,04±1,27	0.920
Distancia entrenudo2	4,37±1,25	4,45±1,73	0.924
Distancia entrenudo3	3,50±2,08	3,95±1,95	0.719

A

continuación se muestran los resultados sobre los parámetros vegetativos de la línea transgénica 14. (Tabla1)

Distancia entrenudo4	3,37±2,25	3,90±1,22	0.677
Distancia entrenudo5	3,37±2,28	3,63±0,83	0.836
Distancia entrenudo6	3,00±2,34	3,50±0,55	0.700
Distancia entrenudo7	3,83±2,02	3,42±0,73	0.764

Tabla 1. Tamaño de órganos vegetativos en línea transgénica siRNA-LHY 14, con un nivel de significación del 0,05.

Los resultados obtenidos con el programa estadístico R, con un nivel de significación de 0,05 sobre los parámetros vegetativos analizados en la línea transgénica 14, indica que no hay diferencias significativas en ningún de los entrenudos analizados y en el número de hojas que presenta el vegetal en doble decusado con respecto al silvestre. En contraposición sí aparecen diferencias significativas entre las plantas silvestres y transgénicas en cuanto al parámetro vegetativo, altura total con un p-valor: 0.025 y la altura de la inflorescencia con un p-valor: 0.002.

Tabla 2. Parámetros florales de la línea transgénica 14. (Tabla 2).

Parámetros florales	Positiva	Negativa	Valor-P
---------------------	----------	----------	---------

Pallate	10,37±2,63	10,79 2,26	0.8253
Altura de los pétalos	14,97 1,88	16, 88 2,47	0.156
Longitud de los sépalos	7,20 0,67	7,78 0,71	0.201
Anchura del tubo	10,00 1,09	9,24 1,34	0.3062
Longitud superior total	36,27 2,62	36,35 3,35	0.963
Expansión inferior de los pétalos	14,12 4,19	15,97 5,92	0.5219
Expansión superior de los pétalos	11,40 2,05	9,13 2,25	0.1168
Longitud de los estambres	19,65 4,82	22,24 3,16	0.3741
Longitud del tubo	15,15 0,71	14,44 1,78	0.2971
Longitud inferior	28,90 4,91	29,02 4,35	0.9654
Longitud del gineceo	21,22 1,63	21,70 1,56	0.6289

Tabla 2. Tamaño de órganos florales en línea transgénica siRNA-LHY 14, con un nivel de significación del 0,05

Respecto a los parámetros florales de la línea 14 sean registrado con el programa estadístico R a un nivel de significación de 0,05, no se observa ninguna diferencia significativa entre vegetales silvestres y transgénicos. Este resultado esta a favor del fenotipo nana ya que el mutante no sufre variaciones con respecto a los parámetros florales del silvestre.

Parámetros vegetativos de la línea transgénica 27. (Tabla 3).

Parámetros vegetativos	Positiva	Negativa	p-valor
Altura total	56±15,64	62,28±19,41	0.517
Nº de hojas en doble decusado	10,14±2,41	7,42±3,10	0.093
Altura hasta la inflorescencia	40,14±11,29	38,42±17,15	0.829
Distancia entrenudo1	2±0,76	3,57±1,64	0.049
Distancia entrenudo2	3,42±1,30	3,85±1,70	0.607
Distancia entrenudo3	3,50±1,77	4,42±4,42	0.458
Distancia entrenudo4	3,85±1,77	2,92±0,18	0.216
Distancia entrenudo5	3,28±1,07	3,40±0,89	0.845
Distancia entrenudo6	3±1,19	3,25±1,25	0.757
Distancia entrenudo7	2,83±1,03	3,37±0,75	0.365
Distancia entrenudo8	3±1,54	3,50±1,32	0.636
Distancia entrenudo 9	3±1,26	3,50±2,12	0.797
Distancia entrenudo 10	2,80±1,64	4±1,41	0.427

Tabla 3. Tamaño de órganos vegetativos en línea transgénica siRNA-LHY 27, con un nivel de significación del 0,05

Sobre los resultados estadísticos en la línea transgénica 27, no se establecen diferencias significativas con el programa estadístico R a un nivel de significación del 0,05, en ningún parámetro vegetativo salvo en el entrenudo 1 que como se puede ver el p-valor es de 0,049.

Parámetros florales de la línea transgénica 27. (Tabla 4)

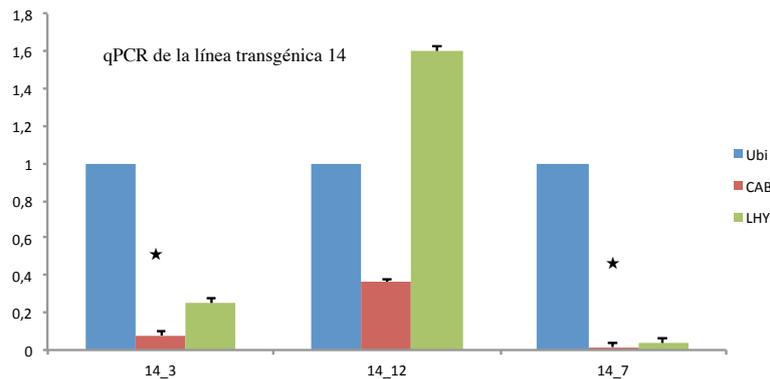
Parámetros florales	Positiva	Negativa	p-valor
Pallate	17,61±2,31	18,18±3,53	0.744
Altura de los pétalos	16,18±4,56	17,41±2,81	0.565
Longitud de los sépalos	7,88±0,72	8,35±0,98	0.365
Anchura del tubo	9,95±0,73	8,88±1,81	0.221
Longitud superior total	30,88±1,63	34,28±2,37	0.016
Expansión inferior de los pétalos	21,81±1,96	22,81±3,98	0.592
Expansión superior de los pétalos	13,44±1,99	14,33±2,70	0.367
Longitud de los estambres	20,07±2,01	20,65±1,93	0.608
Longitud del tubo	14,68±1,99	14,36±2,95	0.827
Longitud inferior	30,10±2,91	30,56±3,92	0.815
Longitud del gineceo	19,40±2,28	20,25±1,76	0.465

Tabla 4. Tamaño de órganos florales en línea transgénica siRNA-LHY 27, con un nivel de significación del 0,05

En la presente tabla se puede ver como no se producen diferencias significativas con el programa estadístico R a un nivel de significación de 0,05 en ningún parámetro florale salvo la longitud superior total de la flor con un p-valor de 0,016, en la línea transgénica 27.

6.3 qPCR, de la línea transgénica 14

Representación gráfica de la qPCR de la línea transgénica 14. (Gráfico 1).



La gráfica 1, muestra el nivel de expresión de dos genes mediante qPCR con un nivel de significación del 0,05, mediante el programa Rest 2008 estos son: Cab y Lhy con respecto al control Ubiquitina. En la planta 14_3 los niveles de expresión de Cab y Lhy son significativamente más bajos que el control con un p-valor de 0.000 en ambos. En la planta 14_7 solo el gen Lhy tienen un nivel de expresión significativamente inferior al control con un p-valor de 0,000. En la planta 14_12 los niveles de expresión en el gen Cab y Lhy no son significativamente más bajos que el control, con un p-valor 0,501;0,831 respectivamente.

La gráfica 1, muestra el nivel de expresión génica de dos genes mediante qPCR, Los resultados obtenidos sean realizado con el programa estadístico, (Rest 2008), con un nivel de significación del 0,05. Estos genes son: Cab y Lhy con respecto al control Ubiquitina cuyo nivel de expresión es 1.

En la planta 14_3 los niveles de expresión de Cab y Lhy son significativamente más bajos que el control con un p-valor de 0.000 en ambos. En la planta 14_7 los niveles de expresión de Cab y Lhy nuevamente son significativamente más bajos que el control, pero solo Lhy tiene un p-valor 0,000 por debajo del nivel de significación del 0,05. En la planta 14_12 solo el gen Cab tiene un nivel de expresión por debajo del control 0.366. Y los dos genes muestran un p-valor no significativo, siendo estos de 0,501; 0,831 respectivamente.

7. DISCUSIÓN

Los resultados de la técnica electroforética (Imagen 1 y 2), con respecto a la presencia en el genoma de *Antirrhium.majus* de la construcción de silenciamiento, LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) por la técnica de silenciamiento génico. Nos indica que existe dicho gen silenciado de 290pb de longitud en las plantas transgénicas analizadas. Por lo tanto, el resultado es positivo y con ello podemos decir que la transformación del gen LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) se confirma tanto en la línea 14 como 27.

Este resultado ha tenido su repercusión en el análisis fenotípico de los parámetros vegetativos y florales de la línea 14 y 27 de *Antirrhium.majus*, al afectar en los parámetros vegetativos y florales en cada una de las líneas transgénicas analizadas.

Los resultados en cuanto a los parámetros vegetativos y florales con el programa estadístico R, presenta las siguientes discusiones de trabajo. Los vegetales a los cuales se les ha transformado su genoma mediante la técnica de silenciamiento génico obteniendo de esta forma plantas transgénicas con silenciamiento para el gen LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), presentan una disminución del crecimiento con respecto al silvestre. Las diferencias estadísticas son muy acusadas en la línea 14 ya que el parámetro vegetativo muestra una diferencia del % en altura total tiene un (p-valor de 0,025). Esto se debe a genes que operan aguas abajo del reloj circadiano, (Fabiola Ruiz-Ramón et al 2013), los cuales presentan una expresión constante. Además se ha podido evidenciar gracias al desarrollo de una cámara de cultivo con visión artificial y análisis automatizado de datos (Navarro et al 2012), observándose que la elongación del tallo sigue un patrón ritmo en silvestre en contraposición del patrón no rítmico que se opera en el mutante nana. Con respecto al parámetro vegetativo de la línea 14, altura hasta la inflorescencia también el programa estadístico R una vez tratado los datos ha encontrado diferencias significativas con respecto al silvestre, con un p-valor de 0,002. Este dato nos hace pensar que hay una relación directa entre el parámetro vegetativo, ya que altura total y el analizado es consecuencia uno del otro. Respecto a esta misma línea 14 analizando los parámetros florales no a salido diferencias significativas, este resultado esta a favor del fenotipo nana ya que el mutante no sufre variaciones con respecto a los parámetros florales del silvestre, el valor del p-valor de 0,049 en el análisis estadístico de R con respecto al entrenudo 1 de la línea 27 no es suficiente para demostrar una diferencia significativa en el crecimiento de la línea mutante con respecto a la línea silvestre, esto se debe a un efecto acumulativo y no a un efecto puntual. Y por último en contraposición de lo dicho anteriormente en el análisis de los parámetros florales de la línea 14, en la línea 27 sí se han obtenido por el programa estadístico R diferencias significativas en cuanto al parámetro floral, longitud superior total de la flor con un p-valor 0.016 . Este resultado nos a llevado a plantearnos ¿Qué es lo que acontece en este punto?, para resolver esta cuestión y explicar el porque de esto fenómeno deberemos de someter al material a nuevas técnicas genéticas encaminadas a dilucidar los mecanismos moleculares que acontecen.

Por último en la gráfica 1, sea analizado la expresión génica de la línea transgénica 14, teniendo como control el gen de la ubiquitina con un valor de expresión de 1 y un grado de significación del 0,05. Los datos nos indican que el nivel de expresión en la transcripción del ARNm en la planta 14.3 para el gen Cab y Lhy esta por debajo del nivel de expresión del gen ubiquitina, dichos niveles de expresión son: 0,078 y 0,251, teniendo estos un p-valor 0,000 y 0,000 respectivamente, por lo tanto el resultado indica que se tratan de una planta transgénica para el gen Lhy. En la planta 14.7 los genes Cab y Lhy nos dan un nivel de expresión por debajo del nivel del control siendo este de 0,016 y 0,043 con un p-valor

0,169 y 0,000 respectivamente, como se puede comprobar este nivel de expresión génica esta muy por debajo del control, pero el p-valor del gen Cab no es significativo, posiblemente he cometido un error de pipeteo en el protocolo de qPCR, esto demuestra que la planta 14.7 es transgénica para el gen Lhy como así lo indica sus niveles de expresión y p-valor. En cuanto a la línea 14.12 para los genes Cab y Lhy el nivel de expresión génica con respecto al control, en el caso del gen Cab es de 0,366 esto indica que su expresión sí esta por debajo del control, pero el p-valor 0,501, esto me hace pensar que he cometido un error en el pipeteo del protocolo de qPCR. La expresión génica de Lhy es de 1,597 y su p-valor 0,831, por lo tanto se concluye que el nivel de expresión esta por encima del control y no es significativa. Seguramente al igual que los otros casos he cometido un error en el pipeteo en el protocolo de qPCR. Los datos indicados se pueden ver en el anexo I.

Los resultados obtenidos permiten concluir de forma preliminar que AmLHY podría tener un efecto sobre el crecimiento vegetativo y reproductivo en *A.majus*. Ya que el análisis fenotípico de una población segregante de líneas de silenciamiento génico del gen LHY en *Antirrhinum majus*, poseen un nivel de expresión génica inferior (mutante nana) respecto al fenotipo silvestre.

Anexo I

14,7	Columna1	Columna2	Columna3	Columna4	Columna5	Columna6	Columna7
Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
ubi	REF	1,0643	1				
cab	TRG	1,1395	0,016	0.010 - 0.027	0.009 - 0.030	0,169	
Lhy	TRG	0,8261	0,043	0.027 - 0.069	0.025 - 0.074	0	DOWN
14,3							
Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
ubi	REF	1,0811	1				
cab	TRG	1,1027	0,078	0.018 - 0.358	0.015 - 0.402	0	DOWN
Lhy	TRG	0,8079	0,251	0.134 - 0.572	0.087 - 0.763	0	DOWN
14,12							
Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
ubi	REF	0,9083	1				
cab	TRG	1,101	0,366	0.142 - 0.961	0.127 - 1.064	0,501	
Lhy	TRG	0,8128	1,597	0.136 - 0.718	0.116 - 0,869	0,831	

Tabla 5. Valores de la expresión génica con un nivel de significación del 0,05 de las plantas 14.7, 14.3, 14.12.

8. BIBLIOGRAFÍA

Pimienta, Euglosio; Muñoz, Alejandro; Ramírez, Blanca C; Méndez, Lucila (2006). «Desarrollo vegetal». *Universidad de Guadalajara*. ISBN 970-27-0923-7, 9789702709237].

Scheres, Bernard (2001). «Plant cell identity. The role of position and lineage». *Plant Physiology* 125: pp. 112-114.

Taiz, Lincoln; Zeiger, Eduardo (2007). *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc. Publishers. ISBN 978-0-87893-866-7.

Egea-Cortines M., Ruiz-Ramon F., Weiss J. (2012) Circadian Regulation of environmental signals in plants. In J Janick, ed, Horticultural Reviews, under review.

Nakamichi N., Kiba T., Henriques R., Mizuno T., Chua N.H., Sakakibara H. (2010) Pseudo-Response Regulators 9, 7, and 5 Are Transcriptional Repressors in the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell* 22: 594-605.

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* 109:3167-3172.

Farinas B., Mas P. (2011) Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation. *Plant Journal* 66: 318-329.

Amaury de Montaigu, Re'ka To'th and George Coupland, Plant development goes like clockwork. Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl von Linne Weg 10, D-50829 Cologne, Germany.

Chen I., Dubnau D. (2003) DNA transport during transformation. *Front Biosci.* 8: s544-s556

Hannon G. J. (2002) RNA interference. Cold Spring Harbour Laboratory, 1BungtownRoad,ColdSpringHarbour,NewYork11724,USA.

Wilson R.N., Heckman J.W., Somerville C.R. (1992) Gibberellin Is Required for Flowering in Arabidopsis-Thaliana under Short Days. *Plant Physiology* 100: 403-408

Blazquez M.A., Green R., Nilsson O., Sussman M.R., Weigel D. (1998) Gibberellins Promote Flowering of Arabidopsis by Activating the LEAFY Promoter. *The Plant Cell* 10: 791-800.

Zagotta M.T., Shannon S., Jacobs C., Meekswagner D.R. (1992) Early- Flowering Mutants of Arabidopsis-Thaliana. *Australian Journal of Plant Physiology* 19: 411-418.

McWatters H.G., Bastow R.M., Hall A., Millar A.J. (2000) The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* 408: 716-720.

Schaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J., Carre I.A., Coupland G. (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93: 1219-1229.

Wang Z.Y., Tobin E.M. (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93: 1207-1217.

Gould P.D., Locke J.C.W., Larue C., Southern M.M., Davis S.J., Hanano S., Moyle R., Milich R., Putterill J., Millar A.J., Hall A. (2006) The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 18: 1177- 1187.

Fabiola Ruíz Ramón. Análisis de alelismo del locus *nana* de *A. Majus* con los genes *Early Flowering 3* y *Late elongated hypocotyl*. Julio 2012.