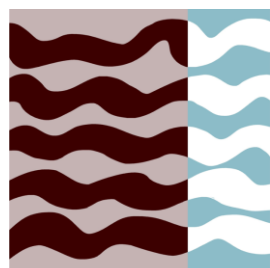


TRABAJO FIN DE GRADO

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
Universidad Politécnica de Cartagena

Efecto del silenciamiento del gen
"ZEITLUPE (ZTL)", involucrado en el
control del ritmo circadiano, sobre el
desarrollo en *Petunia hybrida*



ETSia
Cartagena



Grado en Ingeniería Agroalimentaria y de Sistemas
Biológicos

Cartagena, septiembre de 2016

Autor: Miguel Ángel Casanova de la Rosa
Directora: Julia Weiss
Co-director: Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Effect of silencing the gen "*ZEITLUPE (ZTL)*", involved in the control of the circadian rythm, on the development of *Petunia hybrida*

Índice

1 Resumen.....	7
2 Abstract.....	8
3 Introducción.....	9
3.1 <i>Petunia hybrida</i> , su importancia genética.....	9
3.2 Descripción botánica y taxonómica de petunia.....	10
3.3 Reloj Circadiano.....	14
3.4 Gen <i>ZEITLUPE</i> (ZTL).....	16
3.5 Silenciamiento Génico en plantas Transgénicas por ARN de interferencia.....	19
4 Objetivos.....	22
5 Material y Métodos.....	23
5.1 Material Vegetal.....	23
5.2 Generación de las líneas de interferencia génica.....	23
5.3 Identificación de las líneas transgénicas.....	24
5.4 Medición de parámetros vegetativos y florales de líneas transgénicas.....	25
5.5 Propagación de las líneas transgénicas.....	26
6 Resultados.....	27
6.1 Identificación de plantas transgénicas <i>PhRNAi::ZTL</i>	27
6.2 Fenotipado de plantas transgénicas frente a los controles no-transgénicas.....	29
7 Discusión.....	41
8 Conclusiones.....	44
9 Bibliografía.....	45
10 Anexo.....	50

Índice de tablas

Tabla 1 Comparativa morfológica entre Petunia Juss. y Calibrachoa La Llave.....12

Tabla 2 Mezcla de reacción de PCR y programa del termociclador aplicado en la PCR.....25

TABLAS SUPLEMENTARIAS:

Tabla S1 Longitud y ancho de hojas en la línea PhZTL:iRNA-3 (T1).....50

Tabla S2 Mediciones colorimétricos de clorofila en la línea PhZTL:iRNA-3 (T1).....51

Tabla S3 Mediciones de altura, nº de tallos, tamaño floral, tamaño de hojas y clorofila en la generación T2 de la línea 3 y Mitchell.....52

Tabla S4 Significancias estadísticas de comparación fenotípica en la generación T2 (3.1 versus 3.3 y 3.1 versus Mitchell).....53

Índice figuras

Figura 1 Flor de <i>P. inflata</i> , <i>P. hybrida</i> y <i>P. axillaris</i>	13
Figura 2 Acción y estructura de los dominios receptores flavoproteínas de luz azul en plantas (modificado de (Christie, Blackwood, Petersen, & Sullivan, 2015).....	16
Figura 3 :Modelo del oscilador circadiano en <i>Arabidopsis thaliana</i> (modificado de Staiger, Shin, Johansson, & Davis, 2013).....	18
Figura 4. Procedimiento de la genética inversa.....	20
Figura 5 Estructura del plásmido recombinante pHELLSGATE12 (modificado de Cortés et al. 2014).....	23
Figura 6 Colorímetro SPAD-502Plus	26
Figura 7 Amplificación de ubiquitina y de 35S en la línea <i>PhZTL:iRNA 3</i> en la generación T1 (A) y de ubiquitina y nptII en la generación T2 (B).....	28
Figura 8 Imagen de las plantas de la línea 3 (T1) identificados como transgénicos y no-transgénicos mediante PCR.....	30
Figura 9 Altura de las plantas de la línea 3 en la T1.....	31
Figura 10 Semanas que tarda en florecer la línea 3 de la T1.....	31
Figura 11 Longitud de las hojas de la línea 3 de la T1.....	32
Figura 12 Ancho de las hojas de la línea 3 en la T1.....	33
Figura 13 Diámetro del lóbulo de la flor de la línea 3 en la T1.....	33
Figura 14 Longitud del tubo de la flor de la línea 3 en T1.....	34
Figura 15 Mediciones colorimétricos de clorofila de la línea 3 de la T1.....	34
Figura 16 Imagen de una planta transgénica (3.1.) frente a una no-transgénica (3.3).	35
Figura 17 Promedio de altura en las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2.....	36
Figura 18 Promedio del número de tallos en las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2.....	36
Figura 19 Promedio de longitud de hojas en las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2.....	37
Figura 20 Promedio del ancho de hojas en las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2. Asteriscos indican diferencias significativas de 3.1 frente a 3.3 (rojo) y Mitchell (negro) (*= $p \leq 0,05$).....	38

Figura 21. Promedio del diámetro de la corola de las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2. Asteriscos indican diferencias significativas de 3.1 frente a 3.3 (rojo) y Mitchell (negro) (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$).....	39
Figura 22. Promedio de la longitud del tubo floral de las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2. Asteriscos indican diferencias significativas de 3.1 frente a 3.3 (rojo) y Mitchell (negro) (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$).....	39
Figura 23. Promedio de valores colorimétricos de clorofila en las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2.....	40

1 Resumen

El ritmo circadiano de una planta es controlado por una red compleja de genes, expresados por la mañana, al mediodía y por la noche, con interacciones tanto al nivel de transcripción y traducción. El reloj circadiano afecta a muchos aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo el crecimiento y el tiempo de floración, resistencia al frío, apertura de la flor, la emisión de volátiles y por lo tanto la atracción de polinizadores y la repulsión de herbívoros. La emisión de volátiles florales en *Petunia*, una especie polinizada por insectos activos durante la noche, tiene un pico hacia la noche y es más baja durante el día. Uno de los principales genes del reloj es *Zeitlupe (ZTL)*, que significa cámara lenta. La proteína ZTL tiene tres dominios, un dominio está especializada en la detección de luz azul, un dominio media la interacción proteína-proteína y el tercer dominio se dirige a otras proteínas para la degradación a través del sistema ubiquitina-proteasoma. La función específica de ZTL es la degradación proteasomal de "TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)", otro gen del núcleo del reloj. En caso del gen *ZTL*, la abundancia de ARNm no está regulada por el reloj en *Arabidopsis*, pero los niveles de la proteína tienen su pico al anochecer. Nuestro objetivo es analizar cómo los genes del reloj circadiano controlan aspectos del desarrollo vegetativo y florales en *Petunia hybrida*. La comprensión del control genético sobre el desarrollo floral es un aspecto importante de la interacción con polinizadores.

2 Abstract

The circadian rhythm of a plant is controlled by a complex network of genes belonging to morning, midday and evening loops, which are interacting both on the transcriptional and translational level. The circadian clock affects many aspects of plant development, including growth and flowering time, cold resistance, flower opening, volatile emission and therefore pollinator attraction. Flower volatile emission in *Petunia*, a species pollinated by night active insects, has a peak towards the evening and is lowest during the day.

One of the core clock genes is *ZEITLUPE (ZTL)*, which means slow motion. The protein has three domains, one domain is specialized in light sensing, one domain mediates protein-protein interaction and the third domain targets proteins for degradation via the ubiquitin-proteasome system. The specific function of ZTL is the proteasomal degradation of *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*, another core clock gene. *ZTL* mRNA abundance is not clock regulated in *Arabidopsis*, but ZTL protein levels peak around dusk.

Our objective is to analyse how this gene of the circadian clock controls aspects of vegetative growth and flowering in *petunia*. Understanding the genetic control over flower development is an important aspect of pollination.

3 Introducción

3.1 *PETUNIA HYBRIDA* Y SU IMPORTANCIA GENÉTICA

El género *Petunia* es un miembro de la familia de las Solanáceas nativa de América del Sur. Dentro de la familia de las Solanáceas, *Petunia* forma una rama separada con un número de cromosomas básico de $x = 7$, diferente de la mayoría de otras Solanáceas con $x = 12$ cromosomas, como por ejemplo el tomate, la patata, tabaco, pimiento (Särkinen et al., 2013)

Petunia hybrida es una planta ornamental ampliamente cultivada en todo el mundo. Tiene una vasta gama de color y tamaño de la flor, y el mercado de sus semillas representa un recurso económico importante para muchos países. También tiene una larga historia como un sistema modelo genético. El genoma de sus dos progenitores silvestres, *P. axillaris* y *P. inflata*, fueron secuenciados (Bombarely et al., 2016). Estas secuencias suponen el 91,3% y el 90,2% de cobertura de sus genomas diploides (1.4 Gb; $2n = 14$) que contiene 32.928 y 36.697 genes codificadores de proteínas, respectivamente. Las secuencias del genoma de alta calidad han permitido la identificación de genes ortólogos conocidos de *Arabidopsis* y otras solanáceas y este hecho ha mejorado el valor de *Petunia* como un sistema modelo para la investigación de fenómenos biológicos tales como pequeños RNAs, autoincompatibilidad y ritmos circadianos.

Entre la larga historia de *Petunia* como especie modelo para la investigación científica, destaca el descubrimiento de RNAi (RNA de interferencia), fruto de décadas de investigación sobre la síntesis y regulación de los pigmentos florales. Como consecuencia, la biosíntesis de antocianinas sigue siendo una de las vías más conocidas del metabolismo secundario en cualquier planta.

El desarrollo, la actividad de transposones, autoincompatibilidad genética, y las interacciones con los microbios, los herbívoros y los polinizadores también han sido temas de investigación activos que utilizan *Petunia* como sistema modelo. También se

ha convertido en modelo de elección para estudiar la emisión de volátiles, como los fenilpropanoides y benzenoides que se sintetizan principalmente en la extremidad de la corola, regulada por el ritmo circadiano, la temperatura y la producción de etileno, durante el desarrollo, polinización y senescencia de la corola (*Schuurink et al., 2006*)(*Cheng et al., 2016*), (*Underwood et al., 2005*).

Petunia (*Petunia* × *hybrida*) es un sistema modelo para el estudio de las respuestas post-polinización y el efecto de la síntesis y señalización de etileno ha sido bien caracterizado (*Hoekstra y Weges, 1986* ; *Tang y Woodson, 1996* ; *Jones et al, 2003*) (*Wilkinson et al., 1997* ; *Shibuya et al., 2004*).

Entre otros sistemas de modelo emergente, *Petunia* ocupa un especial papel con varias herramientas genéticas disponibles (Galliot, Stuurman, y Kuhlemeier 2006a). Entre otros rasgos, un tiempo relativamente corto de generación, la facilidad de cultivo, y en particular, la disponibilidad de etiquetado de transposones y la transformación genética, hacen que *Petunia* sea un excelente sistema para el estudio de la genética de rasgos fenotípicos. El etiquetado de transposones se realiza generalmente en el fondo *Petunia hybrida* (W138) que tiene alrededor de 200 copias activas del transposón dTph1 (Gerats et al. 1990), lo que permite la identificación de la secuencia de genes mutagenizados por el efecto de la transposición.

3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y TAXONÓMICA DE PETUNIA

Petunia fue descrita originalmente por Jussieu (1803) basado en el material recogido en Montevideo, Uruguay de dos especies muy distintas, *P. parviflora* y *P. nyctaginiflora* con una corola en forma de embudo y en forma de tubo largo y estrecho, respectivamente. Antes, en 1793, Lamarck describe *Petunia* como *Nicotiana axillaris* Lam. A continuación, las especies de *Petunia* fueron descritas como miembros de diferentes géneros como *Nicotiana* (*Lehmann 1818*), *Fabiana* Ruiz Pav. (*Saint-Hilaire 1824*), *Calibrachoa* La Llave (*La Llave y Lexarza 1825*). En 1846, Miers publicó una

revisión de solanáceas de America del Sur en el que reconoció 10 especies de *Petunia*, la mitad de ellas descritas por primera vez. En 1852, Sendtner publicó una revisión de la Flora Brasileña donde había 13 especies de *Petunia*, nueve de ellas nuevas.

Fries en 1911 publicó la primera monografía de *Petunia* con la aceptación de 27 especies, nueve de los cuales eran nuevas. El tratamiento taxonómico proporcionó una discusión detallada de la circunscripción, la distribución geográfica, y las relaciones de *Petunia* con otros géneros. La monografía de Fries sigue siendo la última revisión completa.

La *Petunia* del jardín se obtuvo por primera vez por la hibridación en 1834 por Atkins, una británica viverista, y pronto se extendió a los jardines europeos (Sink 1984). Hoy en día se cultiva en todo el mundo y es uno de las más importantes de las solanáceas utilizada para fines ornamentales. Muchos autores han investigado el origen de este híbrido ornamental y los mecanismos de la incompatibilidad genética que se encuentra en *Petunia* (Ferguson y Outley 1932; Mather 1943; Mather y Edwardes 1943 Stout 1952; van der Donk 1974; Linskens 1975; Disipador de 1984) y diferentes especies han sido sugeridas como los padres de la *Petunia* ornamental. En 1982, Wijsman considera el origen del híbrido y llegó a la conclusión que se obtuvo de la hibridación de dos especies, una con flores blancas [*P. axillaris* (Lam) Britton et al.], y el otro con flores de color púrpura [*P. integrifolia* (Hook.) Schinz Thell.], cada uno con subespecies geográficas.

Algunas especies de *Petunia* y *Calibrachoa* tienen distribuciones simpátricas y comparten similares atributos vegetativos y florales, por lo que es difícil reconocer el género al que pertenecen. Para ayudar con el reconocimiento de cada género, se comparan los rasgos morfológicos de diagnóstico listados a continuación.

Comparative morphological traits between *Petunia* Juss. and *Calibrachoa* La Llave & Lex. (Solanaceae)

Trait	<i>Petunia</i>	<i>Calibrachoa</i>
Habit	Herbs with non-woody stems	Small shrubs or herbs, woody stems
Duration	Usually annual	Annual or perennial
Brachyblasts	Absent	Present or absent
Leaves	Ovate, elliptic, oblong, or obovate, rarely linear; flat margin	Ovate, elliptic, obovate, oblong, or linear; flat or revolute margin
Inflorescence	Monochasial with opposite leaf-like bracts	Monochasial with opposite leaf-like bracts
Aestivation	Imbricate	Reciprocative (except in <i>C. pygmaea</i>)
Symmetry	Actinomorphic or zygomorphic	Zygomorphic (except in <i>C. pygmaea</i>)
Calyx	Ribs usually not conspicuous; deeply lobed (except in <i>P. atiplana</i> and some coastal populations of <i>P. integrifolia</i>); lobes linear or enlarged toward the apex	Five or ten ribs; lobed usually to the middle, lobes usually narrowed toward the apex
Corolla	Funnelform, campanulate, or salverform; purple, red (bright or orange), pink, or white	Funnelform (salverform, ventricose, and apically constricted in <i>C. pygmaea</i>); purple, red, pink, or whitish
Anthers	Yellow, bluish, or violet	Yellow
Seed coat	Cells with wavy anticlinal walls	Cells with straight anticlinal walls

Tabla 1 Comparativa morfológica entre *Petunia* Juss. y *Calibrachoa* La Llave (Gerats y Stromer 2009) .

En la naturaleza, las especies de *Petunia* son, en su mayoría, anuales con tallos herbáceos y braquiblastos ausente o poco desarrollados. Dado que las especies de la *Petunia* por lo general no son lignificadas y carecen de cualquier sistema subterráneo especial (a excepción de las poblaciones costeras de *P. integrifolia*), podemos suponer que la mayoría de las especies, como *P. axillaris*, *P. integrifolia*, *P. reitzii* y *P. Bonjardinensis*, son especies anuales.

La morfología de las especies de *Petunia* es más uniforme que en *Calibrachoa*. En *Petunia*, las hojas son generalmente sésiles, más raramente pecioladas, ovadas, obovadas o elípticas, raramente son lineales, membranosas, un poco jugosa, planas, y por lo general sin nerviación marcada.

Cada flor está siempre asociada con dos brácteas opuestas en forma de hoja. El patrón simpodial es típico de casi todas las especies de solanáceas (Bell y Dines 1995). Las ramas secundarias se presentan a continuación en las axilas de las brácteas basales.

El desarrollo de la unidad simpodial normalmente es continua, pero a veces puede ser interrumpido de manera que la flor no se produce en un nodo específico.

El cáliz de la mayoría de especies de *Petunia* está profundamente lobulado con lóbulos lineales o en forma de espátula, generalmente hay agrandamiento hacia el ápice.

Petunia comprende plantas de hasta 1 m de altura, con erecto, ascendente, decumbente o procumbente, tallo raramente con raíces en los nudos. Las flores de las inflorescencias simpodiales tienen un cáliz de color verde, por lo general poco visible. El tubo floral es de 1,5-7 cm de largo, y de color púrpura, blanco, rojo (brillante o naranja), o rosa. Los cinco estambres están, por lo general incluido y dispuestos en tres niveles. Las semillas varían en tamaño de 0,4 a 1,4 mm de largo.

El estudio tratará sobre la línea doble haploide “Mitchell” de *Petunia hybrida*. La transformación estable con *Agrobacterium* es muy sencilla en esta línea y permite la creación de líneas transgénicas y el estudio del efecto de genes seleccionados sobre el desarrollo de la planta (Mitchell, Hanson, Skvirsky, & Ausubel, 1980). La *Petunia hybrida*, es un híbrido entre *P. axillaris* y *P. integrifolia* (Figura 1), es fácilmente identificado por su hábito erecto, corola blanca con tubo floral largo, polen amarillo, y un pedicelo flexionada en la etapa de fruta. Las flores emiten un olor en la oscuridad y son visitados por la polilla halcón de la familia Sphingidae (Galeto y Bernardello 1993; Ando et al 2001)



Figura 1 Flor de *P. hybrida* Mitchell, *P. inflata* y *P. axillaris*

Los conjuntos de rasgos florales tales como el color, la morfología, el aroma y la producción de néctar determinan los tipos de polinizadores específicos (Faegri y van der Pijl 1979) en las diferentes especies. El género *Petunia* cuenta con tres especies de polinización: abeja, polilla, y la polinización colibrí. *Petunias* con flores blancas y con estrechos tubos, como *P. hybrida*, están polinizadas por polillas, con proboscis largo para alcanzar el néctar abundante.

3.3 RELOJ CIRCADIANO

Las plantas necesitan coordinar toda su fisiología y su reproducción con la información del ambiente que las rodea. Los ritmos biológicos permiten a las plantas anticiparse a ciertas condiciones exteriores cambiantes. Los relojes biológicos son los encargados de generar los ritmos biológicos, y entre éstos los de mayor relevancia para las plantas son los que ocurren en periodos cercanos a un día o ritmos circadianos (Lucas, 2013). El reloj circadiano es una compleja red de genes que controla numerosos aspectos endógenos (metabólicos o fisiológicos) que se repiten diariamente. Algunos ejemplos incluyen el mantenimiento de órganos fotosintéticos, la emisión de volátiles, el momento de polinización, la floración o los niveles hormonales (Egea et al. 2013). También, el reloj circadiano presenta un amplio espectro de acción, ya que interviene en el control del patrón de expresión de aproximadamente el 30% de los genes de *Arabidopsis* (Fornara et al., 2009). Así pues, esto refleja la importancia del reloj circadiano en el control de procesos celulares básicos y también a nivel de los órganos.

El reloj circadiano es una red compleja que comprende tres capas: transcripcional, postraduccional y metabólico. Juntos juegan un papel en la integración de señales del medio ambiente para crear salidas coherentes para el crecimiento, la adaptación y la puesta a punto del metabolismo secundario. El análisis de la secuencia genómica de *Petunia* reveló la estructura genética del reloj circadiano en *Petunia* en comparación con otros genomas incluido *Arabidopsis* y otras solanáceas (Bombarely et al., 2016). En *Arabidopsis*, el reloj se compone de tres bucles, el bucle de la mañana, el núcleo y el bucle de la noche. La comparación de los genomas de *Petunia* con otras solanáceas indica que el reloj circadiano se ha sometido a una profunda reestructuración de las solanáceas y cada especie parece tener un conjunto diferente de genes. *Petunia* y el

resto de Solanáceas comparten ortólogos individuales para *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *TOC1 (TIMING OF CAP EXPRESSION1)*, *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 3 (PRR3)* *LUX ARRHYTHMO (LUX)* y *ZTL* mientras *PRR7*, *PRR5*, *GIGANTEA (GI)*, *ELONGATION FACTOR 3 Y 4 (ELF3 y ELF4)* son en algunos casos duplicados o triplicados (Bombarely et al., 2016). El conjunto de genes que participan en el reloj circadiano parece ser específico de la especie, y podría explicar la diversidad de los nichos ecológicos colonizados por las Solanáceas.

P. inflata tiene un mayor número de parálogos del bucle noche que *P. axillaris*. El gen *GI* está presente en dos copias en *P. axillaris* y con tres en *P. inflata*, y existen tres copias de *ELF3* en *P. axillaris* y cuatro en *P. inflata*. Estos resultados sugieren una fuerte selección purificadora sobre algunos de los componentes del reloj, pero otros pueden haber sido objeto de una subfuncionalización rápida o redistribución. Los análisis comparativos ayudarán a comprender cómo se ajusta la estructura del reloj para optimizar los resultados específicos, permitiendo así la adaptación a diferentes ambientes

El reloj circadiano controla una gama de procesos como, por ejemplo, el tiempo de floración, la apertura de los estomas, movimiento de las hojas, de expansión del hipocotilo, y la expresión génica y el nivel de control (transcripcional, postranscripcional y postraduccional) indican el grado en que el reloj se involucra en todos los aspectos del desarrollo de la planta (Harmer et al., 2000, 2001; McClung, 2001). La organización molecular del sistema circadiano se ha definido en una serie de organismos modelo fuera de las plantas y consta de un bucle de realimentación negativa de transcripción-traduccion. Aunque un bucle de este tipo, en principio, puede ser sostenida con sólo dos componentes y un retardo de tiempo suficiente, en la práctica la naturaleza molecular del oscilador es más elaborado, con retroalimentación de múltiples componentes en múltiples bucles, como indica el modelo emergente en más de un sistema (Young y Kay, 2001).

Además de la función del oscilador central, el sistema también requiere una vía de entrada de señales que conecta los ciclos de luz o la temperatura del medio ambiente al marcapasos, un proceso conocido como arrastre. Del mismo modo, se requiere un

enlace desde el oscilador arrastrado a las salidas abiertas para imponer la fase apropiada de expresión en los procesos que en realidad están siendo controlados por el reloj. Los análisis moleculares de muchos de los sistemas modelo circadianos han demostrado que un simple flujo lineal de este tipo desde la entrada hasta la salida del oscilador no es un punto de vista realista. En algunas circunstancias, el oscilador puede controlar la sensibilidad de la vía de entrada, potencialmente a través de la modulación circadiano de expresión de los fotoreceptores (*Toth et al., 2001 ; Sharrock y Clack, 2002 ; Cheng et al., 2003 ; Millar, 2003 ; Roenneberg y Merrow , 2003*).

3.4 EL GEN ZEITLUPE (ZTL)

El gen *ZTL* pertenece a la familia de las proteínas F-box [*ZTL, FLAVIN- BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX (FKF1) y LOV KELCH PROTEIN2 (LKP2)*] que contiene un dominio LOV (luz, oxígeno o sensor de voltaje) en el N-terminal, seguido por un dominio de F-caja y seis repeticiones Kelch (Demarsy y Fankhauser, 2009 ; Ito et al, 2012) (Fig. 2). Zeitlupe significa “a cámara lenta” debido a un incremento del periodo circadiano en el mutante *ztl* de *Arabidopsis* (Más, Kim, Somers, & Kay, 2003a).

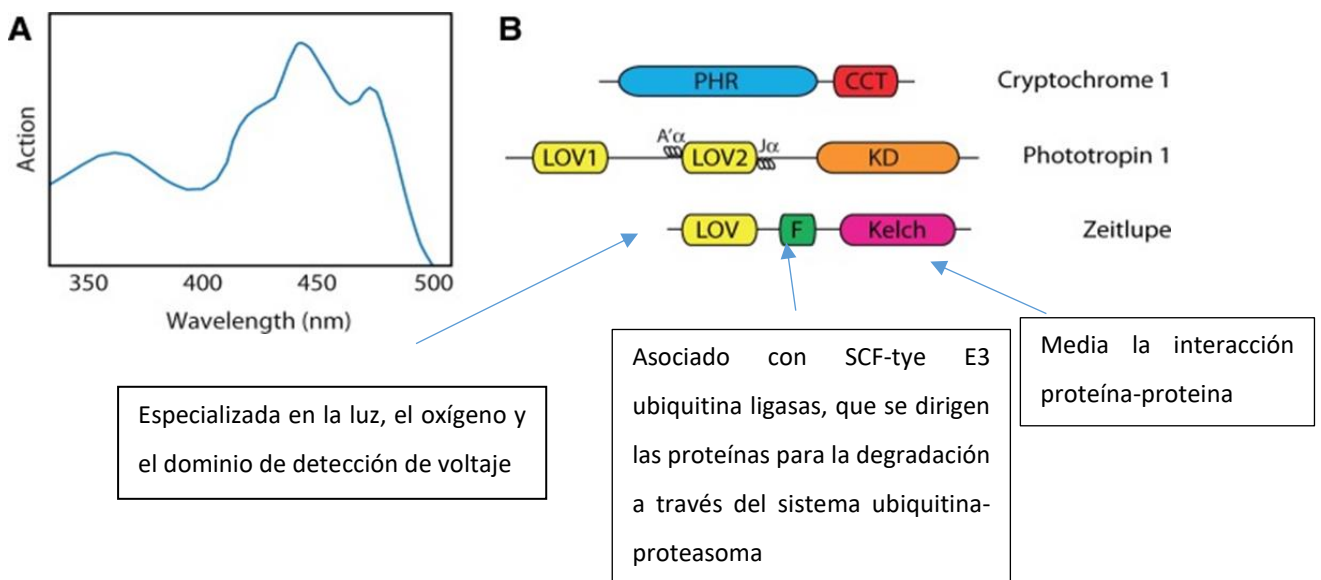


Fig. 2. Acción y estructura de los dominios de receptores flavoproteínas de luz azul en plantas (modificado de Christie et al., 2015).

Las acciones de dominio LOV de ZTL tienen alta homología con los dominios LOV de fototropinas de plantas y de *White Collar 1 (WC-1)* en *Neurospora* (Ballario *et al.*, 1996; Crosson *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2012). Los dominios LOV en estas proteínas se unen a flavinas y funcionan como un interruptor molecular modulado por la luz azul en la activación de la proteína (He *et al.*, 2002 ; . Imaizumi *et al.*, 2003 ; Matsuoka y Tokutomi de 2005).

Los miembros de la familia *ZTL* juegan un papel importante en el control de la degradación y la estabilidad de los componentes asociados con la regulación del reloj circadiano y el control fotoperiódico de floración (Takase *et al.* 2011.). El análisis genético en *Arabidopsis* indica que *ZTL*, *FKF1* y *LKP2* se superponen parcialmente en función (Fornara *et al.*, 2009, Baudry *et al.*, 2010, Takase *et al.* 2011). Mutantes de *Arabidopsis* que carecen *ZTL* están afectados principalmente en el funcionamiento del reloj circadiano (Somers *et al.*, 2000), mientras que mutantes *fkf1* en su mayoría muestran alteraciones en el tiempo de floración (Imaizumi *et al.*, 2003) y mutantes que carecen *LPK2* muestran alteraciones mínimas en la regulación circadiana y floración (Baudry *et al.* 2010). La sobre-expresión de *LPK2* en *Arabidopsis* compromete ambos procesos (Schultz *et al.* 2001).

Las proteínas F-box están asociados con Skp Cullin F-box (SCF)-type ubiquitina ligasas E3, que se dirigen a proteínas para la degradación a través del sistema ubiquitina-proteosoma (Ito *et al.* 2012), mientras que las repeticiones Kelch sirven para mediar en las interacciones proteína-proteína y heterodimerización entre *LKP2* y los otros dos miembros de la familia (Takase *et al.* 2011). En principio, la arquitectura de la proteína principal de la familia *ZTL* es similar a la de criptocromo y fototropina donde se encuentra el módulo fotosensible aguas arriba de una región efectora C-terminal. Fototropina es, sin embargo, el único receptor de luz azul identificado hasta la fecha que contiene dos dominios LOV.

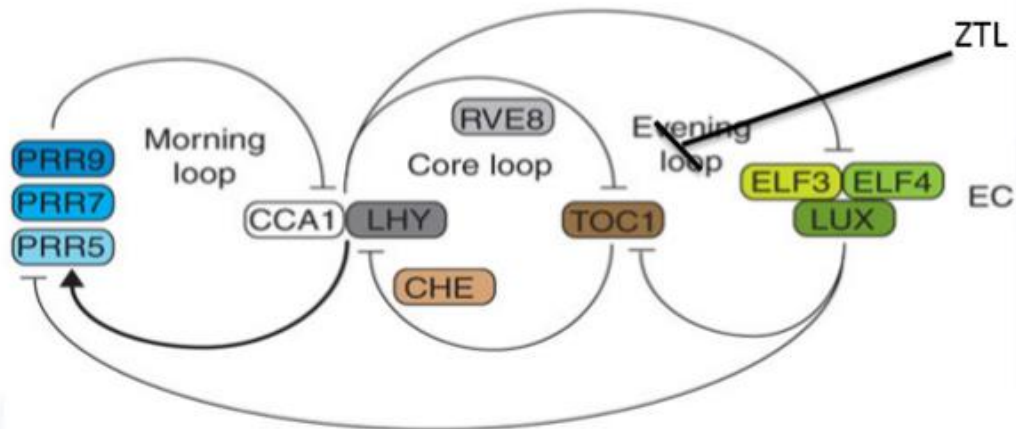


Fig3 :Modelo del oscilador circadiano en Arabidopsis thaliana (modificado de Staiger, Shin, Johansson, & Davis, 2013)..

El lazo del núcleo consiste en los factores de transcripción tipo MYB *CCA1* y *LHY*, y el regulador *TOC1* que se regulan su oscilación recíprocamente. Interconectado con el lazo de núcleo son los bucles de la mañana y de la tarde. En el bucle de la mañana, *CCA1* y *LHY* activan *PRR5*, *PRR7* y *PRR9*, que a su vez inhiben a *CCA1* y *LHY*. En el bucle de la tarde, el complejo de noche con las proteínas *ELF3*, *ELF4* y *LUX*, inhibe la expresión de *PRR9* y quizás otros *PRRs*. El complejo de la noche es en sí el mismo ritmo a través de la represión por parte de *CCA1* y *LHY*. Factores de transcripción adicionales, como *RVE8* y *CHE*, modulan estos bucles interconectados. La proteína *ZTL* está estabilizada por GI, tiene su pico de cantidad cerca del anochecer y conduce a la degradación proteosomal de *TOC1* (Staiger et al., 2013)(Más, Kim, Somers, & Kay, 2003b). El mutante *ztl* en Arabidopsis, una planta de días largos facultativa, está caracterizado por una estabilización de la proteína *TOC1*, niveles bajos de expresión de *LHY* y *CCA1*, un incremento en el ritmo circadiano por 3 horas y un retraso en la floración en días largos, pero no en días cortos. La mutación no afecta el aspecto de la planta (Somers, Schultz, Milnamow, & Kay, 2000).

3.5 EL SILENCIAMIENTO GÉNICO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS POR ARN DE INTERFERENCIA

La expresión génica puede ser regulada tanto a nivel transcripcional como post transcripcional. El silenciamiento génico transcripcional (en inglés, Transcriptional Gene Silencing o TGS) es la consecuencia de la modificación del ADN o de las histonas presentes en la cromatina. Estas modificaciones crean un ambiente de heterocromatina alrededor de un cierto gen, que impide el acceso de la maquinaria transcripcional (factores de transcripción, ARN polimerasas, etc.) suprimiendo la expresión de dicho gen. El silenciamiento génico post transcripcional (en inglés, Post-Transcriptional Gene Silencing o PTGS), en cambio, es un mecanismo que implica la degradación de un ARN mensajero específico (ARNm). La eliminación del ARNm impide su normal traducción y como consecuencia su proteína correspondiente no se sintetiza.

Diferentes trabajos científicos han corroborado las bases moleculares que mandan en la expresión de secuencias endógenas y exógenas de las plantas. Este silenciamiento es controlado por la presencia de ARN de doble cadena y moderado por pequeños ARN de interferencia (si(silencing)ARN). El ARN de doble cadena puede producirse por la presencia de transgenes, por la infección de virus, la expresión de genes endógenos o por medio de la introducción exógena. Aunque se han descubierto otras vías por las que se produce el silenciamiento génico, principalmente se produce a nivel transcripcional y post transcripcional. Una de las vías al silenciamiento génico es a partir de la represión de la traducción de los ARNm; silenciamiento génico post transduccional. El otro mecanismo descubierto en protistas, se basa en la eliminación de regiones de ADN.

También se pueden clasificar según el tipo de ARN involucrado. Pueden estar controlados por microARNs, pequeños ARN de interferencia endógenos (siARNs) o pequeños ARN derivados de virus (viARNs)

El mecanismo se identificó por primera vez en petunias transgénicas, en las que se quería mejorar el color de las flores mediante una sobreexpresión del gen que codificaba una enzima clave para la obtención de pigmentos en los pétalos. Sorprendentemente, muchas de las plantas que tenían copias extras de dicho gen no mostraron el color violeta o rojo intenso esperado, pero aparecieron flores

parcialmente o completamente blancas. Los investigadores notaron que en las plantas transgénicas tanto el gen endógeno como el introducido habían sido “silenciados”, y aunque desconocían el mecanismo molecular involucrado, llamaron a este fenómeno como “co-supresión de la expresión génica” (Li, Xi, Zhang, Huang, & Li, 2001)

Mediante el descubrimiento a fondo de las bases moleculares del silenciamiento génico, se podría avistar en un futuro la posibilidad de utilizar líneas transgénicas de plantas como bio-productoras de RNAi con propósitos de investigación, así como para uso terapéutico. En años anteriores ya se había demostrado la eficacia de plantas como fábricas productoras de RNAi frente al virus de la influenza de mamíferos (Zhou et al., 2004), así como para la producción de anticuerpos, vacunas y diversos fármacos (Daniell et al., 2001). En este sentido, cada vez es mayor el número de genomas de plantas disponibles que suponen una inmensa cantidad de información de secuencias que se encuentran a la espera de ser caracterizadas funcionalmente. Por otra parte, el silenciamiento génico mediado por RNAi y la metilación de ADN dirigida por ARN, han permitido ejecutar aproximaciones al campo de la genética reversa para averiguar la función de genes de interés.

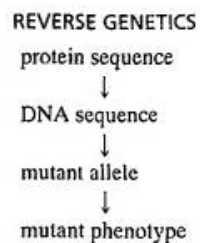


Fig. 4. Procedimiento de la genética inversa

Con la generalización del uso de técnicas de biología molecular y la finalización de un buen número de proyectos genoma, el número de secuencias génicas disponibles excede en ordenes de magnitud el número de genes con función biológica conocida.

La genética inversa pretende llenar ese vacío mediante técnicas que permitan caracterizar funcionalmente un gran número de genes. Para ello se deben producir individuos en los que la actividad de genes concretos haya sido alterada. Se trata de producir mutantes para genes concretos.

Comparada con la genética clásica, la genética reversa frecuentemente implica el uso de tecnologías sofisticadas para manipular la expresión génica, por ejemplo, transgénesis

Más allá de las funciones fisiológicas que se le atribuyen al silenciamiento génico, como la defensa antiviral y la regulación de la expresión génica, este fenómeno puede ser utilizado además como herramienta para identificar genes “blanco” para el desarrollo de nuevas drogas, eliminar la función de un gen en particular, y hasta potencialmente eliminar la expresión de un gen responsable de una cierta enfermedad. También es posible utilizar el silenciamiento génico como una herramienta para generar mejores cultivos y alimentos, como, por ejemplo, plantas resistentes a virus, mejoras en la calidad de los aceites, y otras mejoras nutricionales en granos y tubérculos.

4 Objetivos

Nuestro objetivo es analizar cómo el gen *ZTL* (*ZEITLUPE*) del reloj circadiano controla aspectos del desarrollo vegetativo y floral en *Petunia hybrida*. La comprensión del control genético sobre el desarrollo floral es un aspecto importante de la interacción con polinizadores.

5 MATERIAL Y MÉTODO

5.1 MATERIAL VEGETAL

Se sembraron semillas esterilizadas de la variedad homocigota de *Petunia hybrida* var. Mitchell en placas Petri con medio de cultivo MS (Murashige and Skoog) que contenía 4,4 g L⁻¹ de sales MS , 2,5 g L⁻¹ de gelrite y 25 g L⁻¹ de sacarosa. Las plantas recién germinadas fueron trasplantado a botes estériles con medio de cultivo MS hasta alcanzar unos 10 cm de altura. Después se aplicó el protocolo de transformación de hojas con *Agrobacterium tumefaciens* (Manchado-Rojo et al.2014). Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en cámara de cultivo con luz fluorescente con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 22°C y 8 horas de oscuridad a 15°C.

5.2 GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS DE INTERFERENCIA GÉNICA

Las hojas fueron infectadas con *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA-105, transformado con el plásmido pHELLSGATE 12, que lleva la construcción para la interferencia, es decir un fragmento de 200 bp de la zona 3' no transcrita en el gen *ZTL*. La secuencia del gen fue identificada a partir de la secuencia genómica de los parentales silvestres *P. axillaris* and *P. inflata* (Bombarely et al 2016).

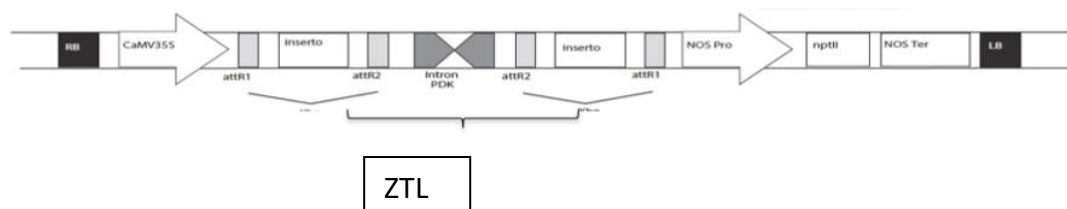


Fig. 5 Estructura del plásmido recombinante pHELLSGATE 12 (modificado de Cortés et al. 2014).

Las hojas infectadas fueron cultivadas *in vitro* en placas Petri con los medios de cultivos MS adecuados para la formación del callo y después de hojas y raíces. También se le añadió kanamicina en concentración de 50mg/l como marcador de selección de líneas transgénicas. En las plantas, la kanamicina es el agente selectivo utilizado más

comúnmente, normalmente en concentraciones que van de 50 a 500 mg / l. Es muy eficaz en la inhibición del crecimiento de las células no transformadas.

Las hojas fueron cortadas y transferidas a placas de enraizamiento (Manchado et al 2014). Una vez alcanzado aproximadamente 4 cm de altura, se cambiaron a macetas con una mezcla de substrato, vermiculita, perlita y fibra de coco (1:1:1:1) y cubierto durante las primeras semanas con una capa de plástico transparente para evitar la deshidratación de las plántulas. Después de dos semanas las plantas fueron llevadas al invernadero en la Finca Tomas Ferro, ubicada en la Palma.

5.3 IDENTIFICACIÓN LINEAS TRANSGÉNICAS

Para identificar las plantas transgénicas, se extrajo ADN genómico de hojas para posteriormente aplicar una PCR. Aproximadamente 100 mg de hojas fueron triturados en nitrógeno líquido y se añadió 460 µl de tampón de lisis CTAB con 1% de mercaptoetanol y 1 µl de RNaseA, seguido por un calentamiento a 65°C durante 25 min. EL ADN fue separado de los demás compuestos mediante un tratamiento con 400 µl de cloroformo. Para precipitar el ADN, se añadió 200 µl de isopropanol al sobrenadante, seguido por una centrifugación a 15000 rpm durante 20 min. El ADN precipitado fue lavado finalmente con 100 µl de etanol y resuspendido en 20 µl de agua.

Para hacer la PCR se utilizó el procedimiento y los compuestos descrito en la tabla 2. Los ciclos de cambio de temperatura fueron repetidos 35 veces. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1,5% y fue separado en buffer TAE a 90V.

0,5 µl de ADN
0,5 µl cebador 1
0,5 µl cebador 2
0,5 µl dNTP
0,125 µl Taq
5 µl Buffer
13,38 µl de agua

Temperatura	Tiempo
94 °C	30''
55 °C	30''
68 °C	30''

Tabla 2 Mezcla de reacción de PCR y programa del termociclador aplicado en la PCR.

Para la identificación de plantas transgénicas, se emplearon los cebadores NPTII small F 5'-CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG-3' y NPTII small R 5' CGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG-3' para la amplificación del gen nptII de resistencia a kanamicina (Cortes et al, 2014) y los cebadores 35S1 5'-GCTCCTACAAAT GCCATCA-3' y 35S2 5'- GARTAGTGGGATTGTGCGTCA-3' para la amplificación del promotor 35S CMV (cauliflower mosaic virus) (Cardarelli et al , 2005). La calidad del ADN genómico fue comprobada mediante PCR con cebadores para la ubiquitina: ubi for 5'-TGGAGGATGGAAGGACTTTGG-3' y ubi rev 5'-CAGGACGACAACAAGCAACAG-3'.

5.4 MEDICIÓN DE PARÁMETROS VEGETATIVOS Y FLORALES EN LÍNEAS TRANSGÉNICAS

Todas las mediciones fueron aplicadas en las generaciones T1 y T2 de la línea 3 durante días cortos (Octubre – febrero). Los parámetros analizados fueron: altura, número de tallos, diámetro de las hojas y flores, tiempo de floración, nivel de clorofila.

Para medir la altura de los tallos, hojas y flores se utilizaron un metro y un pie de rey. Se midió la altura del tallo más largo. En cuanto a las hojas se tomaron 12 muestras de cada planta; 4 hojas basales, 4 en la zona media y 4 hojas terminales. Se midieron el diámetro de corola y longitud de tubo en 4 flores por planta.

La clorofila se midió con un colorímetro SPAD-502Plus (fig.6) que determina la cantidad relativa de clorofila presente, midiendo la absorbancia de la hoja a dos longitudes de onda. Las medidas se toman *in situ* sin necesidad de cortar muestras de hojas y se consigue simplemente proyectando luz a través de una hoja. De cada planta se tomaron 10 muestras de diferentes hojas de la zona central de la planta para medir la clorofila. Se realizó un análisis estadístico ANOVA con el programa Stat Plus ($p \leq 0,05$; 0,01; 0,001) en el que se compara las plantas transgénicas con las no transgénicas de la misma generación y/o con plantas de Mitchell no transformadas.



Figura 6 Colorímetro SPAD-502Plus

5.5 PROPAGACIÓN de las líneas transgénicas

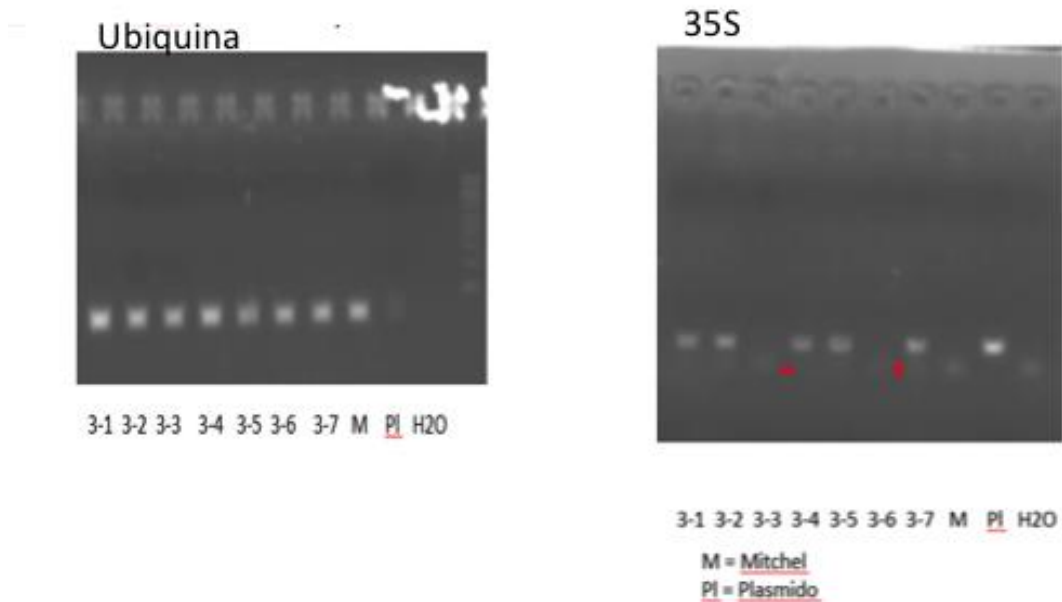
Para la propagación de las líneas de interés, se autopolinizaron varias flores por planta. Se recolectaron las semillas de las cápsulas maduras. Una parte de las semillas fueron sembrados directamente en vermiculita y se cultivaron en el interior de una cámara de cultivo. Las plántulas de aproximadamente 1 cm de altura fueron trasplantados a macetas con una mezcla de sustrato, vermiculita, perlita y fibra de coco (1:1:1:1) y cultivados en el invernadero. Las alícuotas de las semillas fueron almacenadas a 4 °C para su mantenimiento durante un largo periodo de tiempo.

6 Resultados

6.1 Identificación de plantas transgénicas *PhRNAi::ZTL*

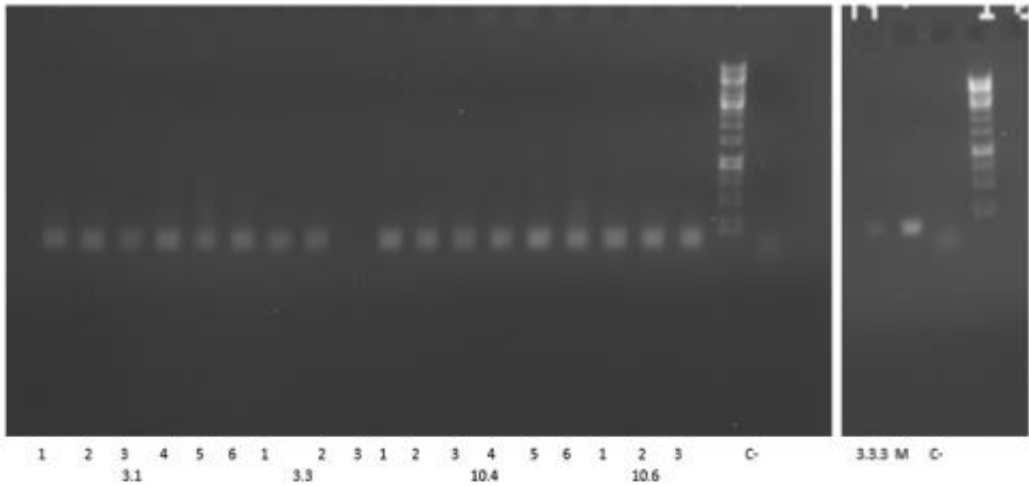
En las figuras 7 se muestran los productos de amplificación con cebadores para ubiquitina y 35S o nptII de la línea 3 en la generación T1 y T2. En paralelo se aplicó la PCR a un control positivo que consiste en el ADN del plásmido pHELLSGATE12 y dos controles negativos, el ADN genómico de una planta control no transgénica (M y W115) y un control de agua para poder averiguar cuáles eran transgénicas y no transgénicas. Marcadas con un asterisco rojo se encuentra la línea 3.3 y 3.6 como líneas no transgénicas, mientras las demás plantas amplificaron para 35S o nptII.

(A)



(B)

Ubiquitina



nptII



Fig. 7. Amplificación de ubiquitina y de 35S en la línea *PhZTL:iRNA 3* en la generación T1 (A) y de ubiquitina y nptII en la generación T2 (B).

La relación de 2 plantas no transgénicas y 5 plantas transgénicas en la línea *PhZTL: iRNA 3* (T1) se ajusta a una segregación de 3:1. Un tercio de las transgénicas serán homocigotas para el transgén y otras heterocigotas. Las líneas no transgénicas como la planta 3.3 nos servirá como control para el fenotipado de las líneas de interferencia. Las plantas de la población segregante T2, *PhZTL: iRNA 3*, amplificaron para el gen *nptII* (con excepción de 3.1.1 que dio una señal muy floja) lo que indica que la planta 3.1 probablemente es homocigota para el transgén.

6.2. Fenotipado de plantas transgénicas frente a los controles no-transgénicas.

El trabajo consiste en un fenotipado exhaustivo de las plantas e incluye la medición del tamaño de la planta, tamaño de hojas, tamaño de flores, tiempo de floración y clorofila en hojas. En la figura 8 se puede observar el aspecto de las plantas transgénicas y no transgénicas. Las plantas transgénicas crecen de una forma más compacta y tardan más en florecer.

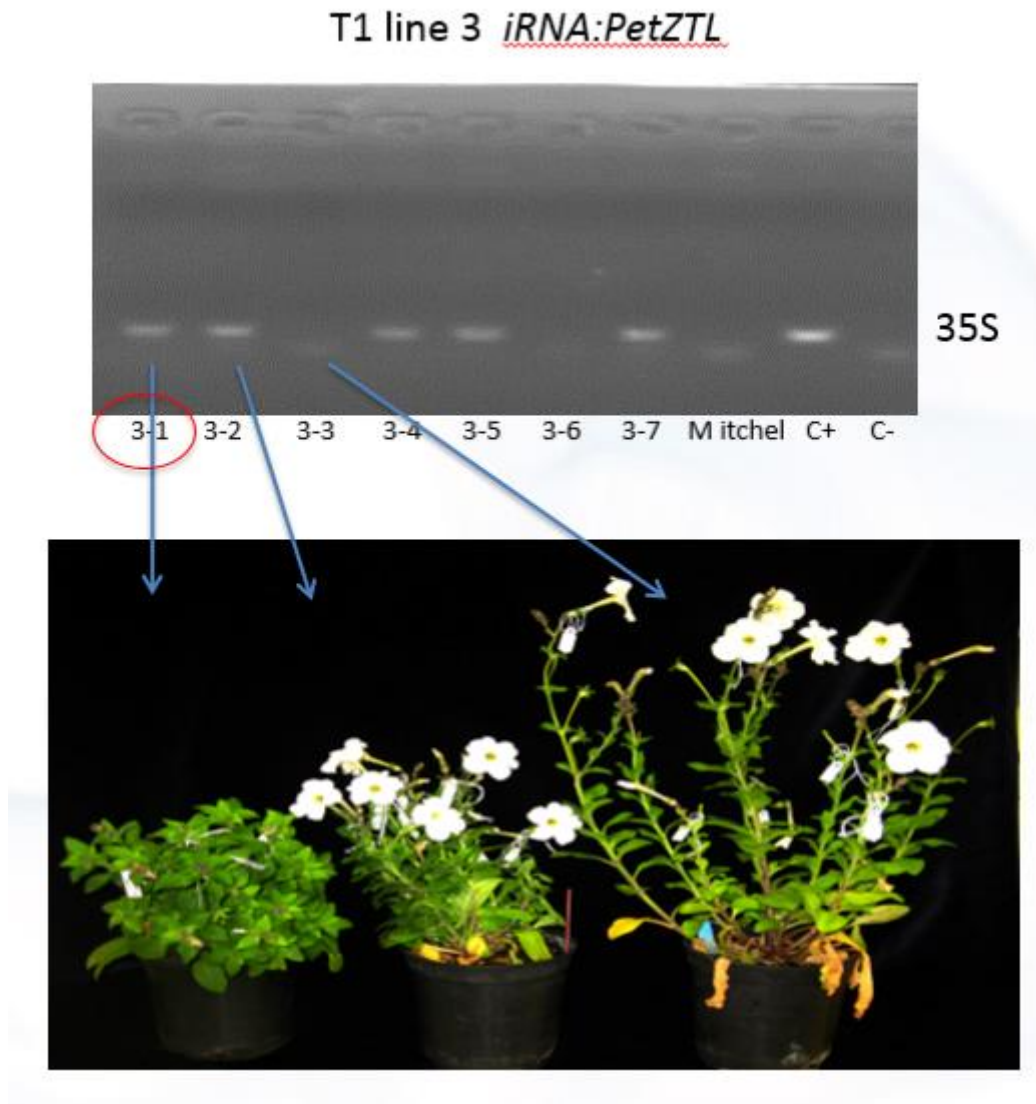


Fig. 8 Imagen de las plantas de la línea 3 (T1) identificados como transgénicos y no-transgénicos mediante PCR.

La medición de la altura de las plantas fue repetida dos veces. La segunda medición coincidió con la aparición de inflorescencias en todas las plantas. Como se puede observar en la figura 9, las plantas transgénicas alcanzaron una altura inferior a las plantas no transgénicas.

Con respecto al tiempo de floración (fig. 10), destaca la planta transgénica 3.1, probablemente homocigota para el transgén, que tardó seis semanas más en florecer

comparado con la planta 3.3 (no transgénica), mientras las demás plantas, probablemente heterocigotas para el transgén, florecieron simultáneamente o incluso antes de las no transgénicas.

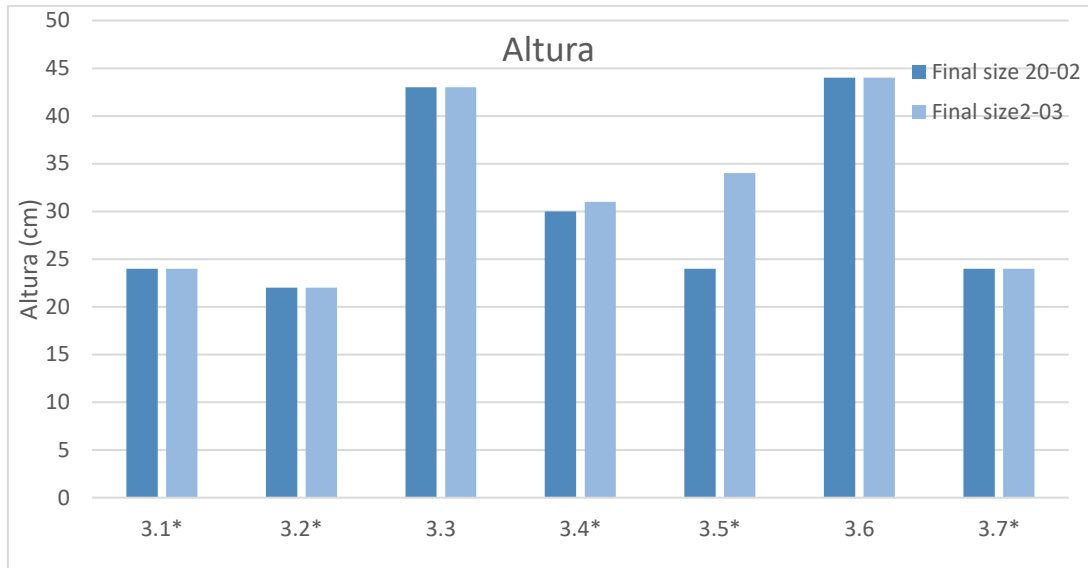


Fig. 9 Altura de las plantas de la línea 3 en la T1

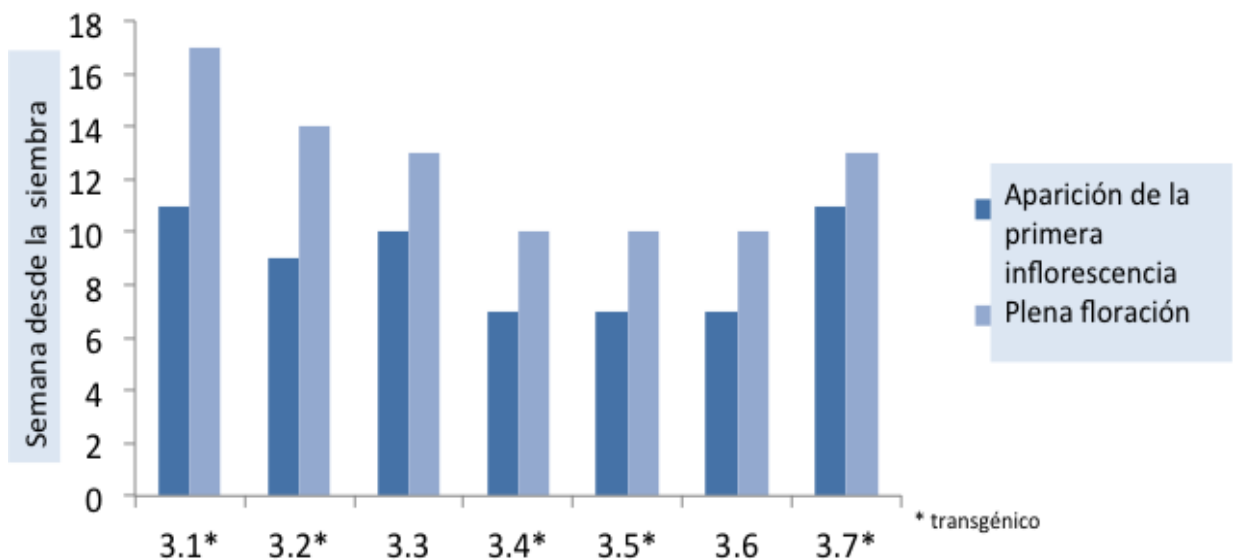


Fig.10 Semanas que tarda en florecer la línea 3 de la T1

En cuanto al tamaño de las hojas (figuras 11 y 12), las plantas transgénicas no mostraron diferencias frente a las no transgénicas en longitud y ancho de hojas de

posición superior y central, mientras las hojas basales fueron significativamente menos largas en caso de la planta 3.2 y significativamente menos anchas en caso de las plantas 3.1 y 3.2 comparado con la planta 3.3 (no transgénica).

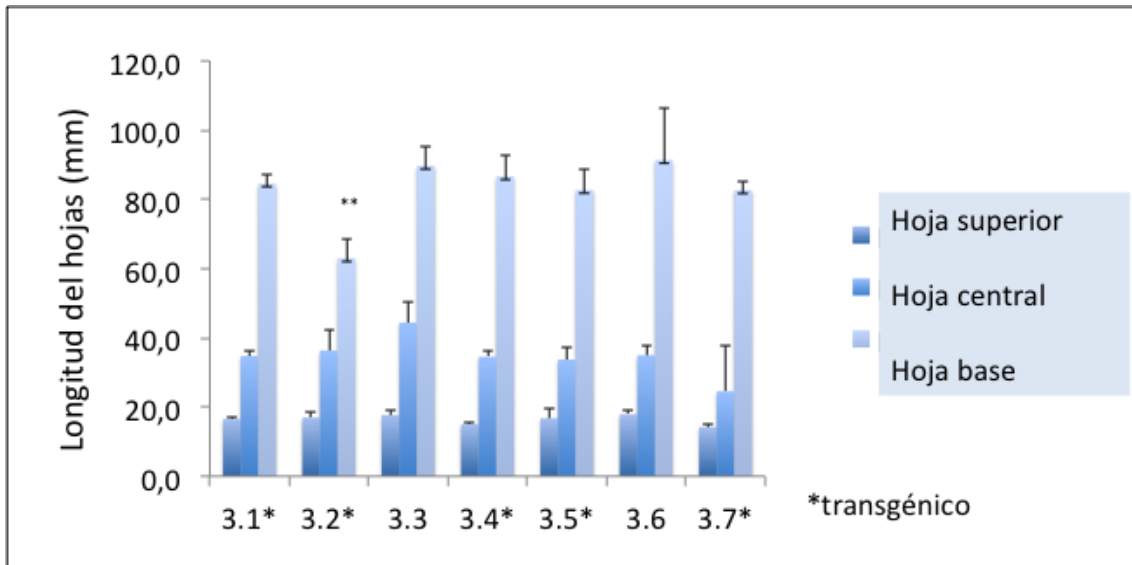


Fig.11 Longitud de las hojas de la línea 3 de la T1. Columnas marcadas con un asterisco indican una diferencia significativa del parámetro frente a la planta 3.3. (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$)

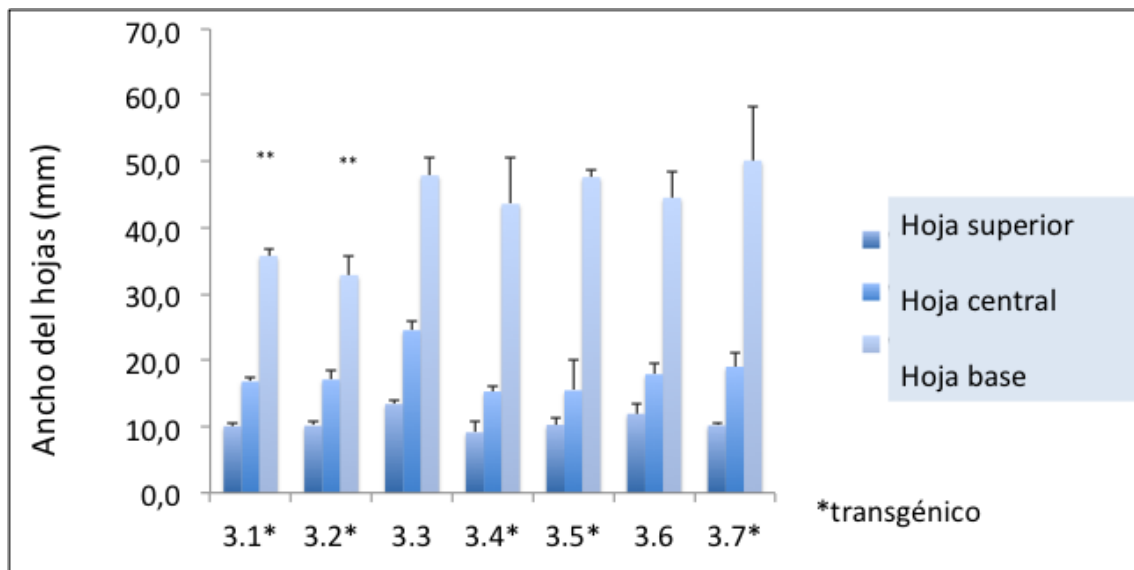


Fig. 12 Ancho de las hojas de la línea 3 en la T1. Columnas marcadas con un asterisco indican una diferencia significativa del parámetro frente a la planta 3.3. (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$).

Con respecto al tamaño floral, se observó una reducción significativa en el diámetro del lóbulo (fig. 13) y en la longitud del tubo floral (fig. 14) en casi todas las plantas transgénicas de la línea 3 en la T1 excepto en la planta 3.7.

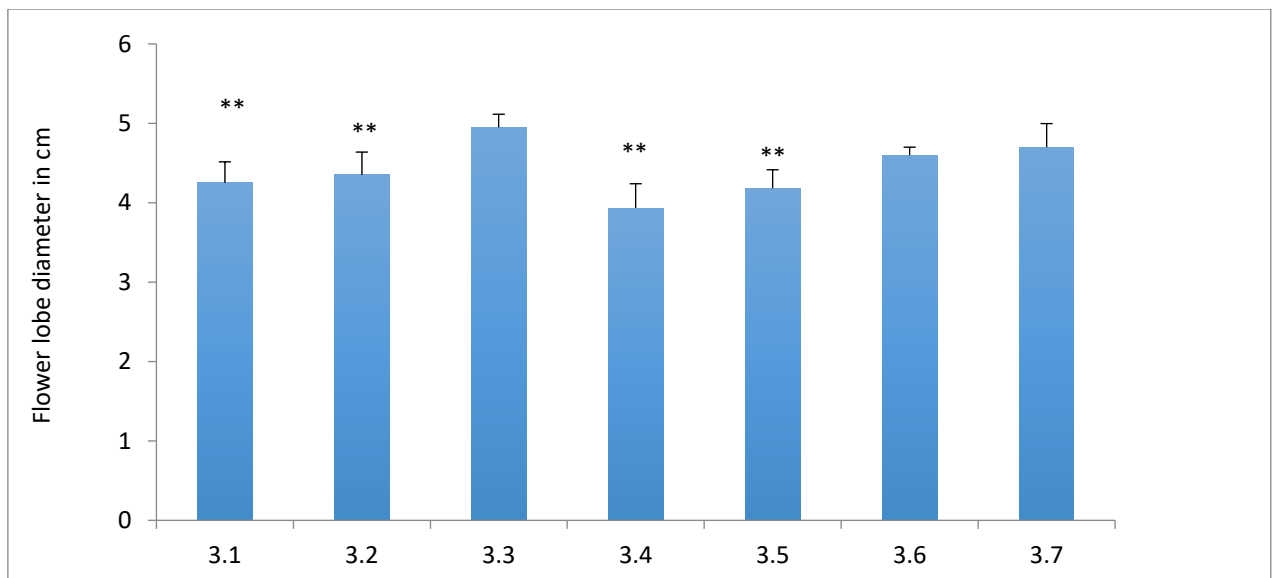


Fig. 13 Diámetro del lóbulo de la flor de la línea 3 en la T1. Columnas marcadas con un asterisco indican una diferencia significativa del parámetro frente a la planta 3.3. (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$).

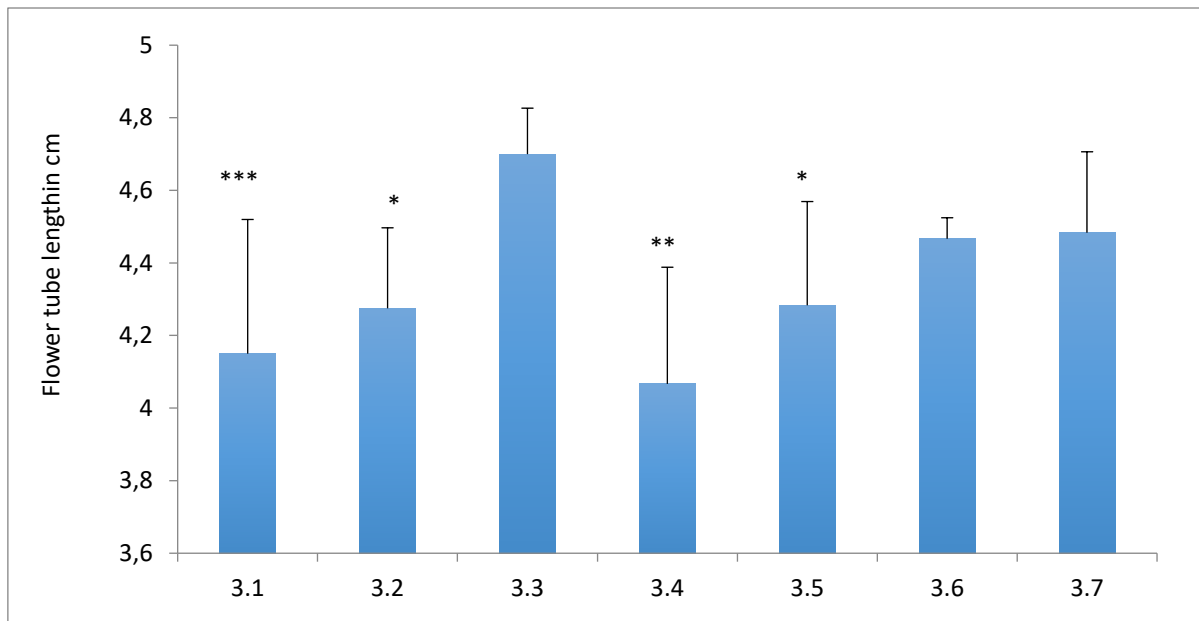


Fig. 14 Longitud del tubo de la flor de la línea 3 en T1. Columnas marcadas con un asterisco indican una diferencia significativa del parámetro frente a la planta 3.3. (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$).

Los niveles de clorofila fueron muy parecidos en las plantas transgénicas y no transgénicas de la línea 3 (T1). Aunque las plantas tenían un aspecto más verde (fig. 16), la única planta con valores colorimétricos significativamente superior a la planta control 3.3 fue la planta transgénica 3.5.

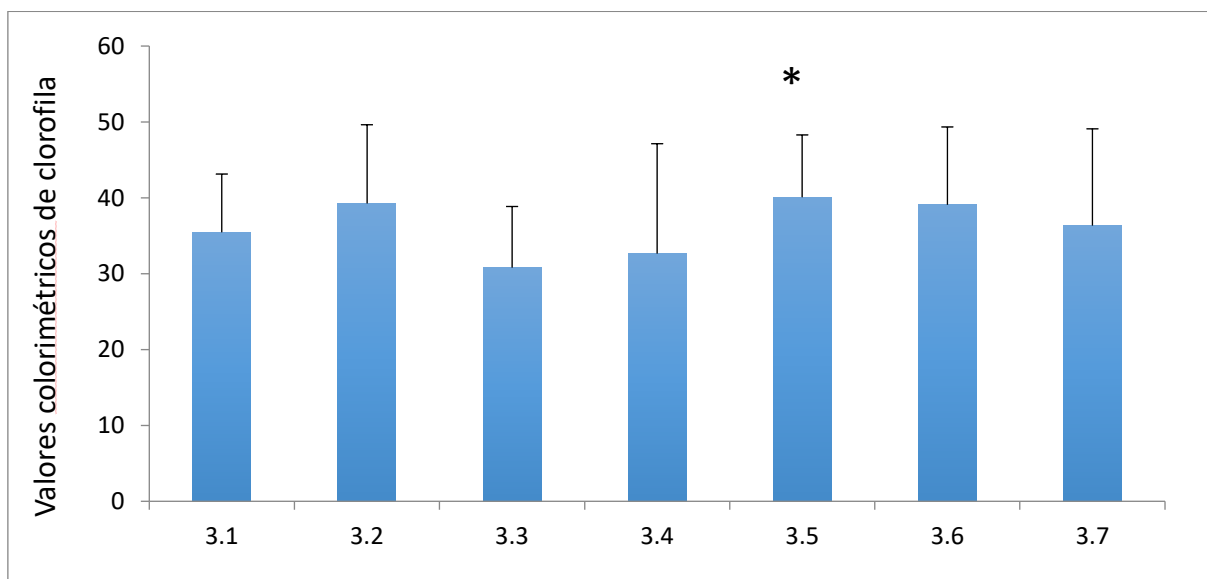


Fig. 15 Mediciones colorimétricos de clorofila de la línea 3 de la T1. La columna marcada con un asterisco indica una diferencia significativa del parámetro frente a la planta 3.3. (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$).



Fig. 16. Imagen de una planta transgénica (3.1.) frente a una no-transgénica (3.3)

Para el fenotipado de la generación T2, se seleccionaron tres plantas descendientes de las líneas 3.1 y 3.3 y de plantas control no transformadas "Mitchell". Los datos fueron comparados entre 3.1 y 3.3 y también entre 3.1 y Mitchell para analizar la significancia de las diferencias.

Las plantas de la línea 3.1 fueron más bajas (fig. 17) y con un número de tallos superior (fig. 18) a las de la línea 3.3 y Mitchell. Esta diferencia no fue significativa en caso del número de tallos y fronterizo ($p = 0,059$) en caso de la altura.

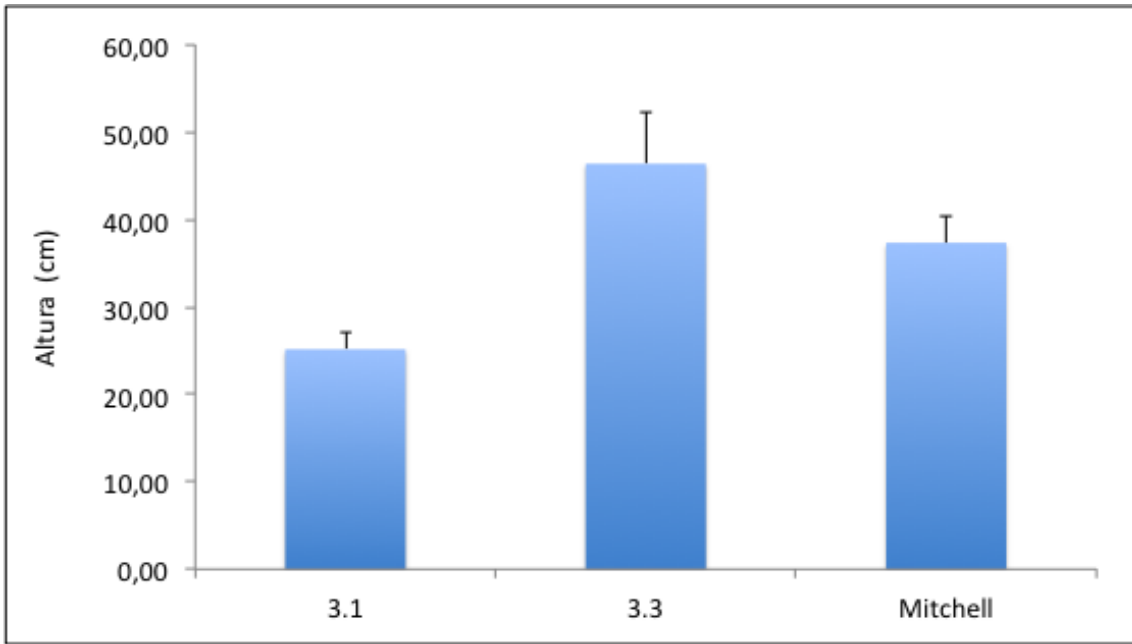


Fig. 17. Promedio de altura las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2

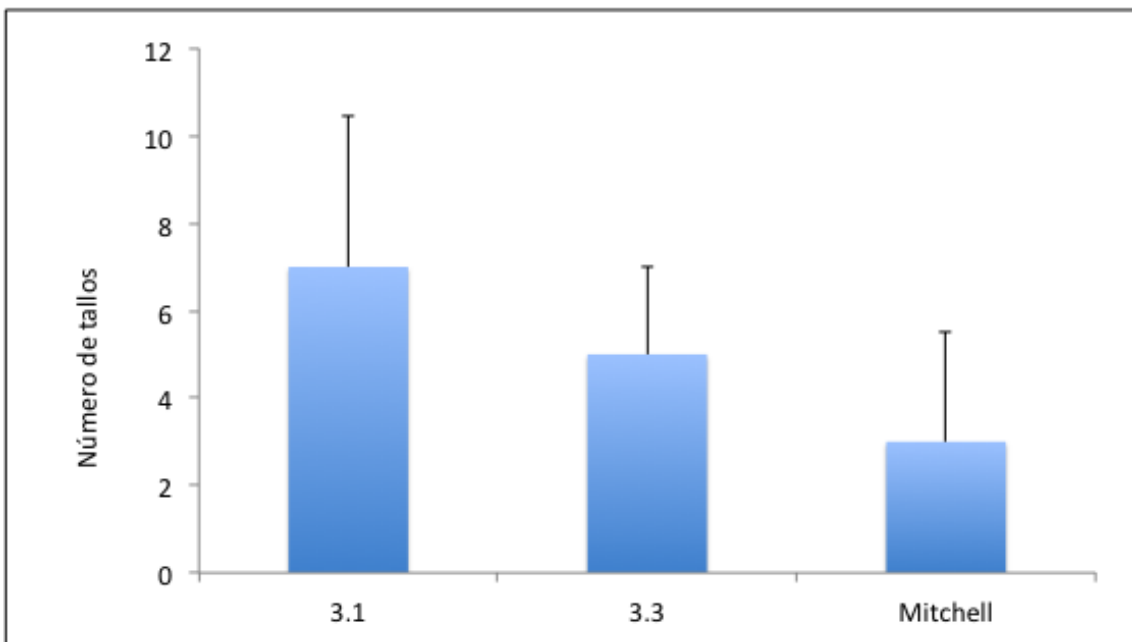


Fig. 18. Promedio del número de tallos de las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2.

El tamaño de las hojas de zonas superiores, centrales y basales, tanto en longitud como en anchura, no mostraron diferencias significativas excepto en caso del ancho de la hoja central, que fue más pequeño en plantas de la línea 3.1 frente a 3.3 y Mitchell.

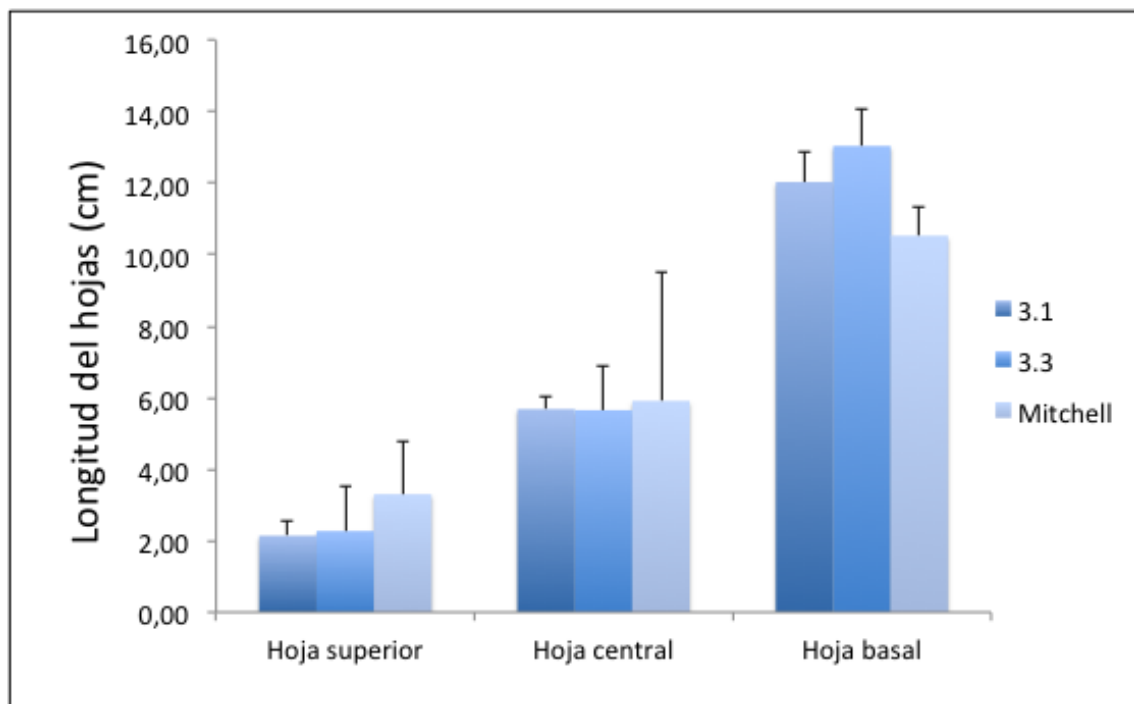


Fig. 19. Promedio de longitud de hojas en las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2

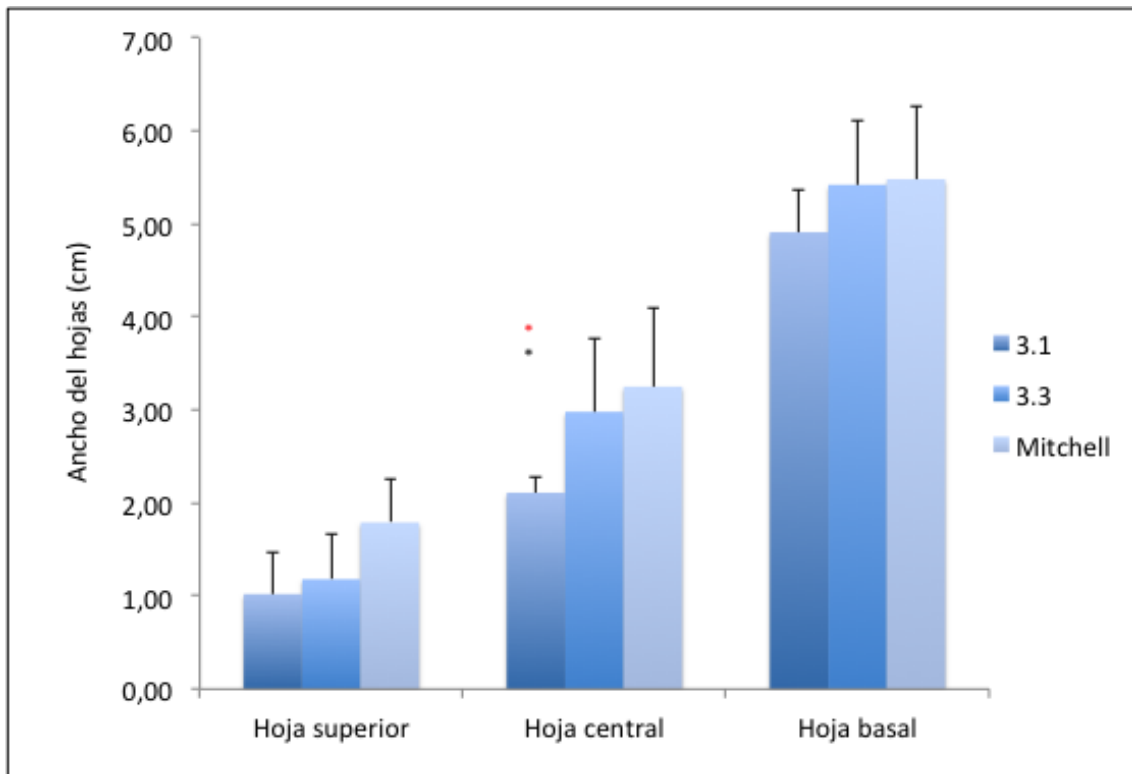


Fig. 20. Promedio del ancho de hojas en las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2. Asteriscos indican diferencias significativas de 3.1 frente a 3.3 (rojo) y Mitchell (negro) (*= $p \leq 0,05$)

Se observó un tamaño significativamente inferior de las flores, tanto en el diámetro de la corola (fig. 21) como en la longitud del tubo (fig. 22), en las plantas de la línea 3.1 frente a 3.3 y Mitchell. Plantas de la línea 3.1 florecieron entre 4-6 semanas después de la línea 3.3 (datos no presentados).

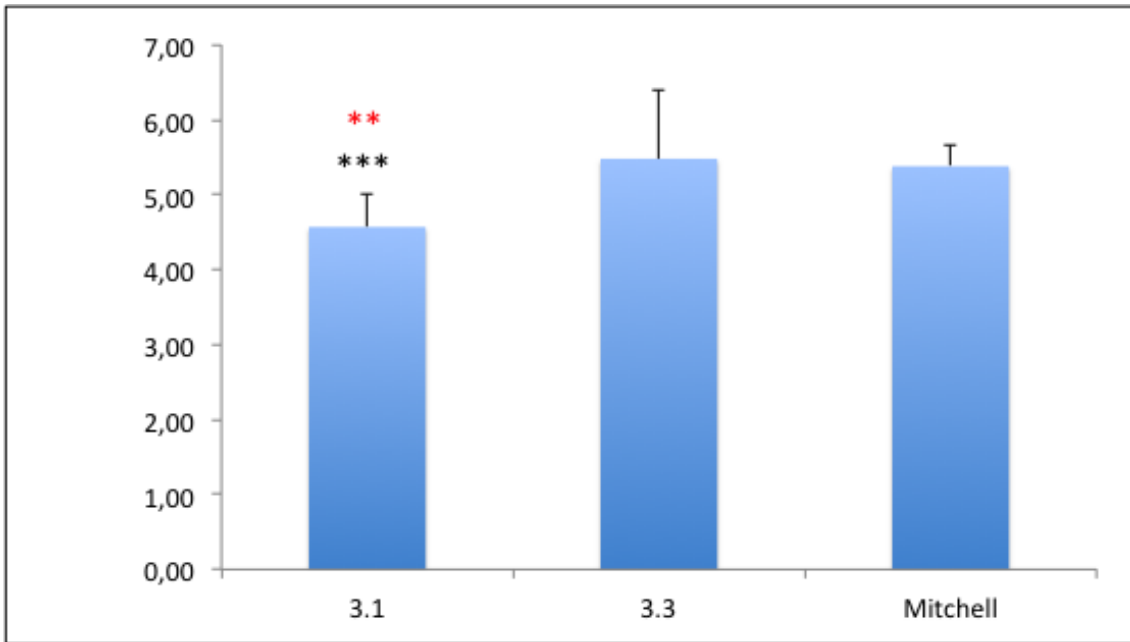


Fig. 21. Promedio del diámetro de la corola de las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2. Asteriscos indican diferencias significativas de 3.1 frente a 3.3 (rojo) y Mitchell (negro) (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$).

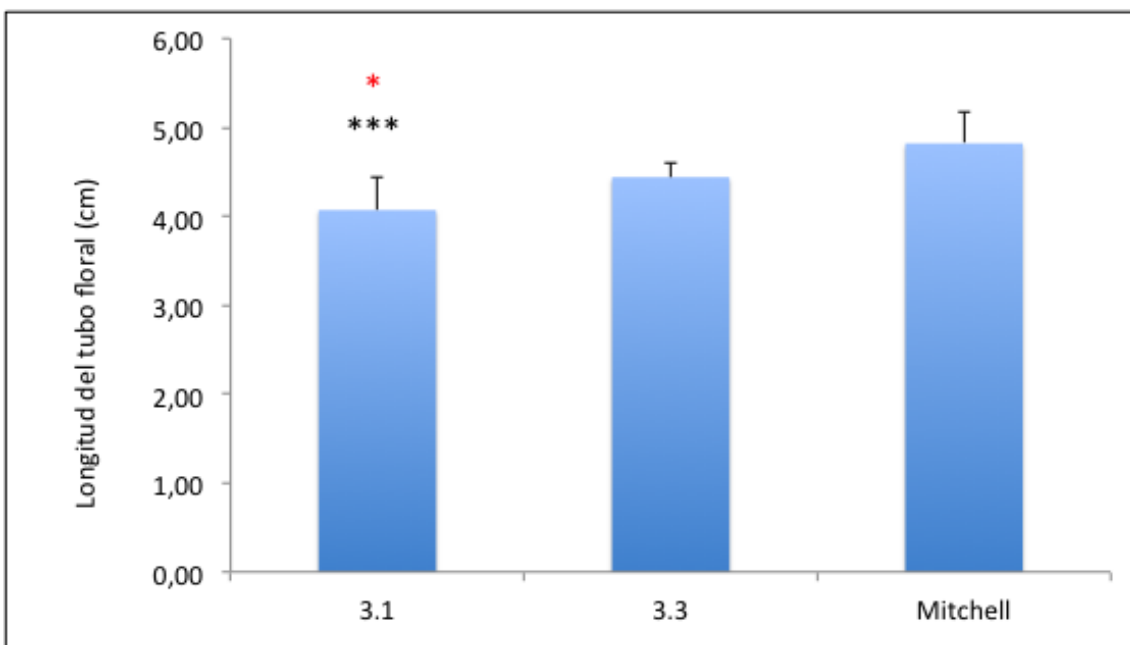


Fig. 22. Promedio de la longitud del tubo floral de las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2. Asteriscos indican diferencias significativas de 3.1 frente a 3.3 (rojo) y Mitchell (negro) (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$).

Los valores colorimétricos de clorofila no difirieron significativamente entre plantas transgénicas y no transgénicas o no-transformadas (fig. 23).

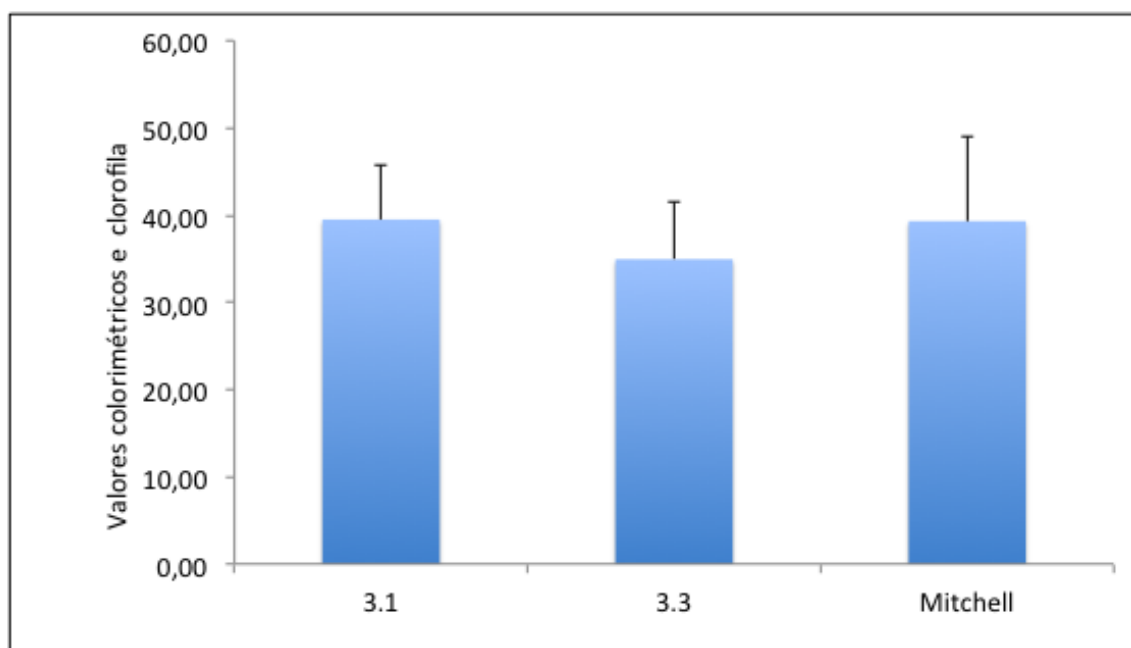


Fig. 23. Promedio de valores colorimétricos de clorofila en las líneas 3.1, 3.3 y Mitchell en la T2.

7 Discusión

De las siete plantas analizadas en la T1, dos resultaron no-transgénicas según la prueba de amplificación del gen 35S por PCR. Esta segregación se ajusta a una segregación mendeliana de 3:1 para el transgén. Una de tres plantas transgénicas estadísticamente es homocigota. El hecho de que dos plantas, la 3.1 y la 3.2, mostraron diferencias significativas en casi todos los parámetros indica, que se trata probablemente de homocigotas con un efecto de silenciamiento más pronunciado frente a las plantas heterocigotas. La amplificación del gen marcador *nptII* en la población segregante T2 de la línea 3.1 indica que se trata realmente de una planta homocigota.

Plantas *PhZTL: iRNA*, silenciadas para el gen *ZTL*, mostraron una forma de crecimiento más compacta y con una reducción significativa en la altura de los tallos. El tamaño de las hojas solo fue afectado ligeramente por el silenciamiento con una reducción de longitud y ancho de las hojas basales en la T1 y de la anchura de hojas centrales en la T2 de la línea homocigota. El contenido de clorofila en las hojas fue parecido.

El silenciamiento no solo afectaba el desarrollo vegetativo, sino también el crecimiento de órganos florales, que mostraron una reducción significativa en el diámetro de la corola y en la longitud del tubo. Experimentos de silenciamiento del gen *PhAINTEGUMENTA (ANT)*, un gen que afecta la división y expansión celular en órganos laterales, mostró un efecto diferencial sobre el tubo y la corola (Manchado et al. 2014). Por lo tanto, hay que tratar estos tejidos como órganos separados con respecto al patrón de expresión génica. Nuestros datos demuestran que el gen *ZTL* tiene un efecto reductor general sobre el desarrollo, tanto vegetativo como generativo. Estos resultados contrastan las observaciones de mutantes de *ZTL* en *Arabidopsis*, que no está afectado en el tamaño de órganos (Somers, Schultz, Milnamow, & Kay, 2000), indicando que la función de un gen específico no es universal para todas las especies.

La función de *ZTL* como gen clave del ritmo circadiano se ve reflejado en el hecho que mutantes *ztl* en *Arabidopsis*, una especie de floración en días largos facultativa, muestran un incremento en el ritmo circadiano por 3 horas y un retraso en la floración en días largos pero no en días cortos (Somers, Schultz, Milnamow, & Kay, 2000). La proteína de *ZTL* regula la degradación de la proteína *TOC1*, un gen del núcleo central del oscilador circadiano (Mas et al. 2003a y b). Por lo tanto, el silenciamiento de *ZTL* interrumpe el sistema de regulación del ritmo circadiano por interacción génica recíproca. En *Petunia*, el silenciamiento del gen *ZTL* muestra un efecto idéntico sobre la floración con un retraso en la aparición de las inflorescencias. En contrario a *Arabidopsis*, este efecto ocurre en *Petunia*, una especie de floración de días cortos facultativa, en época de días cortos. Esta observación comprueba que la función del gen *ZTL* interactúa con genes que controlan el tiempo de floración como el gen *CONSTANS* (McClung 2006).

Con respecto al valor aplicado del silenciamiento de *ZTL*, también para otras especies, hay que destacar que hoy en día las flores y plantas forman parte del diseño y decorado de un jardín, del interior de una casa de oficinas, salas, halls, etc. Además de los aspectos estéticos, y de los beneficios al medio ambiente circundante, como son mejorar la calidad del aire, humidificarlo y reducir el ruido, varios estudios han demostrado beneficios a nivel psicológico, reduciendo el estrés y generando una mejora anímica. Existe una preferencia para plantas más pequeñas compactas que aguanten más tiempo floreciendo ya que mucha gente no dispone de gran espacio y requiere de variedades de plantas más pequeñas. También entre las horticulturas se puede observar la tendencia de crear variedades de hojas pequeñas (Martínez-Sánchez et al. 2012). Además, plantas más compactas y de menor tamaño pueden significar un ahorro en espacio y necesidad de entutorado y por lo tanto una reducción en costes de producción. Una modificación del tamaño floral y del tiempo de floración puede ser relevante tanto desde el punto de vista ornamental como en relación a la interacción con polinizadores ya que los atributos florales determinan el comportamiento de los polinizadores. En el género de *Petunia* existen complejos síndromes de polinización para polillas nocturnos (*P. axillaris*) y abejas diurnas (*P. integrifolia*), con características

diferencias florales en el color, forma de corola, morfología de estambres y pistilo, cantidad y calidad de néctar y fragancia (Stuurmann et al. 2004). Nuestros resultados demuestran que una mutación en solo un gen puede afectar drásticamente estos atributos florales y por lo tanto el comportamiento de los polinizadores y la fertilidad de una especie.

8 Conclusiones

En *Petunia*, el silenciamiento de *ZTL*, un gen clave del oscilador circadiano, no solo afecta el tiempo de floración, pero también el desarrollo vegetativo y generativo con una reducción general de los órganos. Este resultado contrasta las observaciones en *Arabidopsis*, donde mutaciones en *ZTL* no afectan el crecimiento.

Mientras la mutación de *ZTL* en *Arabidopsis* afecta esta especie en días largos, *Petunia* está afectado en días cortos, demostrando la interacción del gen *ZTL* con genes que controlan el tiempo de floración.

Los efectos más pronunciados del silenciamiento de *ZTL* en *Petunia* consisten en la forma de crecimiento con plantas más compactas y en un tamaño reducido de las flores, tanto de la corola como del tubo. Junto con el cambio en el tiempo de floración, un silenciamiento de *ZTL* puede ser de interés aplicado para otras especies tanto desde el punto de vista ornamental como horticultural.

9 Bibliografía

- Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., Bao, M., Bapaume, L., Barry, C. S., ... Kuhlemeier, C. (2016). Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature Plants*, 2(6), 16074.
- Baudri A., Ito S., Song Y. H., Strait A. A., Kiba T., Lu S., Henriques R., Pruneda-Paz J. L., Chua N. H., Tobin E. M., et al. (2010). F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. *Plant Cell* 22, 606–622
- Ballario P., Vittorioso P., Magrelli A., Talora C., Cabibbo A., Macino G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.* 15, 1650–1657
- Bell, A.D. and Dines, T.D. (1995) Branching patterns in the Solanaceae. In: P.C. Hoch and A.G. Stephenson (Eds.), *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. Missouri Botanical Garden, St. Louis, pp. 157–17
- Cheng, S., Fu, X., Mei, X., Zhou, Y., Du, B., Watanabe, N., & Yang, Z. (2016). Regulation of biosynthesis and emission of volatile phenylpropanoids/benzenoids in *petunia* × *hybrida* flowers by multi-factors of circadian clock, light, and temperature. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 107, 1–8.
- Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., & Sullivan, S. (2015). Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant & Cell Physiology*, 56(3), 401–13.
- Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q., and Liu, Y. (2003). WHITE COLLAR-1, a multifunctional *Neurospora* protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *J. Biol. Chem.* 278, 3801–3808.
- Demarsy E., Fankhauser C. (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 69–74
- Ferguson, M.C. and Ottley, A.M. (1932) Studies in *Petunia*. II. A redescription and additional discussion of certain species of *Petunia*. *Amer.J.Bot.* 19, 385–407

- Fornara F., Panigrahi K. C., Gissot L., Sauerbrunn N., Rühl M., Jarillo J. A., Coupland G. (2009). Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev. Cell* 17, 75–86
- Galletto, L. and Bernardello, L. (1993) Nectar secretion pattern and removal effects in three species of Solanaceae. *Can. J. Bot.* 71, 1394–1398
- Galliot, C., Stuurman, J. and Kuhlemeier, C. (2006a) The genetic dissection of floral pollination syndromes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 78–82.
- Gerats, A.G.M., Huits, H., Vrijlandt, E., Marana, C., Souer, E. and Beld, M. (1990) Molecular characterization of a nonautonomous transposable element (dTph1) of Petunia. *Plant Cell* 2, 1121–1128
- Gerats, T. & Stromer, J. Petunia (2009) Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics. Eds. Gerats, T. & Stromer, J. Springer Verlag GmbH.
- Hoekstra, F.A., Weges, R., 1986. Lack of control by early pistillate ethylene of the accelerated wilting of Petunia-hybrida flowers. *Plant Physiol.* 80, 403–408
- He Q, Cheng P., Yang Y., Wang L., Gardner K. H., Liu Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297, 840–843
- Ito S., Song Y. H., Imaizumi T. (2012). LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in Arabidopsis. *Mol. Plant* 5, 573–582
- 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, 302–306
- Jones, M.L., Langston, B.J., Johnson, F., 2003. Pollination-induced senescence of ethylene sensitive and insensitive petunias. In: Vendrell, M., Klee, H., Pech, J.C., Romotaro, F. (Eds.), *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III*. IOS Press, Amsterdam, pp. 324–327
- Li, Y., Xi, Y., Zhang, Z., Huang, X., & Li, Y. (2001). Co-suppression in transgenic Petunia hybrida expressing chalcone synthase A (chsA). *Science in China. Series C, Life Sciences / Chinese Academy of Sciences*, 44(6), 661–8.

- La Llave, P. and Lexarza, J.J.M (1825) Calibrachoa. *Novorum vegetabilium Descriptiones* 2:3.
- Linskens, H.F. (1975) Incompatibility in *Petunia*. *Proc. Royal Soc. London*, B, 188, 299–311
- Molecular Phylogenetics and Evolution. Volume 81, December 2014, Pages 19–28
- Matsuoka D., Tokutomi S. (2005). Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13337–13342
- Mather, K. and Edwardes, P.M.J. (1943) Specific differences in *Petunia*. III. Flower color and genetic isolation. *J. Genet.* 45, 243–260
- Manchado-Rojo M, Weiss J, Egea-Cortines M. (2014) Validation of *Aintegumenta* as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnol J.* 12(8):1053-65.
- Martínez-Sánchez, A., Luna, M.C., Selma, M.V., Tudela, J.A., Abad, J. & Gil, M.I. (2012). Baby-leaf and multi-leaf green and red lettuce are suitable raw material for the fresh-cut industry. *Postharvest Biology and Technology* 63 (1), 1-10.
- Más, P., Kim, W.-Y., Somers, D. E., & Kay, S. A. (2003a). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 426(6966), 567–70.
- McClung (2006). Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell* 18 (4,) 792-803.
- Mitchell, A. Z., Hanson, M. R., Skvirsky, R. C., & Ausubel, M. (1980). Anther culture of *Petunia*: genotypes with high frequency of callus, root, or plantlet formation. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*, 100(2), 131–145.
- Millar, A.J. (2003). A suite of photoreceptors entrains the plant circadian clock. *J. Biol. Rhythms* 18, 217–226.
- Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*, Tom Gerats, Judith Strommers; Springer
- Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in *petunia* flowers, Robert C. Schuurink, Michel A. Haring, David G. Clark

- Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). Ando, T. et al. *Ann. Bot. (Lond.)*. 2001; 88: 403–413
- Roenneberg, T., and Merrow, M. (2003). The network of time: Understanding the molecular circadian system. *Curr. Biol.* 13, R198–R207
- Särkinen, T., Bohs, L., Olmstead, R. G., Knapp, S., Bombarely, A., Rosli, H., ... Bremer, K. (2013). A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 214.
- Schoorink, R. C., Haring, M. A., Clark, D. G., Ando, T., al., et, Verdonk, J. C., ... Verlinden, S. (2006). Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Trends in Plant Science*, 11(1), 20–25.
- Somers, D. E., Schultz, T. F., Milnamow, M., & Kay, S. A. (2000). ZEITLUPE Encodes a Novel Clock-Associated PAS Protein from Arabidopsis. *Cell*, 101(3), 319–329.
- Staiger, D., Shin, J., Johansson, M., & Davis, S. J. (2013). The circadian clock goes genomic. *Genome Biology*, 14(6), 208.
- Stuermann, J., Hoballah, M.E., Broger, L., Moore, J., Basten, C. & Kuhlemeier, C. (2004). Dissection of floral pollination syndromes in *Petunia*. *Genetics* 168 (3), 1585-1599.
- Saint-Hilaire, A. (1824) *Histoire des plantes les plus remarquables du Brésil et Paraguay*. Paris, Belin.
- Somers D. E., Schultz T. F., Milnamow M., Kay S. A. (2000). *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101, 319–329
- Schultz T. F., Kiyosue T., Yanovsky M., Wada M., Kay S. A. (2001). A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 2659–2670
- Staiger, D., Allenbach, L., Salathia, N., Fiechter, V., Davis, S.J., Millar, A.J., Chory, J., and Fankhauser, C. (2003). The Arabidopsis SRR1 gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes Dev.* 17, 256–268
- Sharrock, R.A., and Clack, T. (2002). *Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes*. *Plant Physiol.* 130, 442–456
- Sink, K.C. (1984) *Petunia*. In: K.C Sink (Ed.) *Petunia: Monographs on Theoretical and Applied Genetics* 9. Springer-Verlag, Berlin, pp. 3-9

- Stout, A.B. (1952) Reproduction in Petunia. *Memoirs of the Torrey Bot. Club* 20, 1–202.
- Tang, X., Woodson, W.R., 1996. Temporal and spatial expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers. *Plant Physiol.* 112, 503–511
- Toth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A.J., Nagy, F., and Kozma-Bognar, L. (2001). Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 127, 1607–1616
- Takase T., Nishiyama Y., Tanihigashi H., Ogura Y., Miyazaki Y., Yamada Y., Kiyosue T. (2011). LOV KELCH PROTEIN2 and ZEITLUPE repress Arabidopsis photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1. *Plant J.* 67, 608–621
- Underwood, B. A., Tieman, D. M., Shibuya, K., Dexter, R. J., Loucas, H. M., Simkin, A. J., ... Clark, D. G. (2005). Ethylene-Regulated Floral Volatile Synthesis in Petunia Corollas. *PLANT PHYSIOLOGY*, 138(1), 255–266.
- van der Donk, J.A.W .M. (1974) Gene activity and the incompatibility reaction in Petunia. In : H.F. Linskens (Ed.), *Fertilization in Higher Plants*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 279–292.
- van der Pijl, A. (1982) *Principles of Dispersal in Higher Plants*, 2nd Edn. Springer-Verlag, Berlin.
- Villwock, J.A. and Tomazelli, L.J. (1995) Geologia costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8, 1–45
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Clark, D.G., Bleecker, A.B., Chang, C., Meyerowitz, E.M., Klee, H.J., 1997. A dominant mutant receptor from Arabidopsis confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nat. Biotechnol.* 15, 444–447
- Young, M.W., and Kay, S.A. (2001). Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev Genet* 2, 702–715.

10 ANEXO

Tabla S1. Longitud y ancho de hojas en la línea *PhZTL:iRNA-3* (T1)

	Longitud	Ancho	Longitud	Ancho	Longitud	Ancho
	Hoja superior		Hoja central		Hoja base	
3.1	24,00	15,00	59,40	28,40	95,80	54,20
	16,50	10,00	35,70	17,40	82,40	35,20
	16,90	10,50	35,60	16,80	87,40	35,10
	16,20	9,70	33,00	16,20	83,60	37,00
Promedio	18,40	11,30	40,93	19,70	87,30	40,38
Desviación	3,74	2,49	12,38	5,82	6,05	9,26
						**p=0,0089
3.2	16,60	9,60	63,60	34,00	72,30	34,00
	17,50	10,90	29,60	15,50	59,80	36,00
	15,40	9,60	40,00	18,20	69,60	30,60
	18,00	9,90	39,40	17,60	59,60	32,00
Promedio	16,88	10,00	43,15	21,33	65,33	33,15
Desviación	1,14	0,62	14,44	8,53	6,59	2,36
					**p=0,0018	**p=0,0071
3.3	28,60	19,00	45,20	28,20	97,30	47,10
	21,70	17,00	33,30	19,00	90,00	50,90
	15,50	11,50	45,30	24,60	87,00	43,00
	15,90	11,70	54,50	30,00	92,00	49,90
Promedio	20,43	14,80	44,58	25,45	91,58	47,73
Desviación	6,14	3,79	8,69	4,85	4,33	3,54
3.4	15,90	11,70	54,50	30,00	92,00	49,90
	15,70	10,40	36,00	15,90	89,00	50,90
	14,70	7,30	32,50	14,50	91,00	43,00
	14,70	9,70	35,00	15,50	80,00	36,90
Promedio	15,25	9,78	39,50	18,98	88,00	45,18
Desviación	0,64	1,85	10,11	7,37	5,48	6,54
3.5	14,00	8,80	72,40	35,60	112,40	55,00
	18,70	10,80	36,00	15,40	88,60	47,00
	13,60	9,00	29,40	11,00	76,80	48,90
	18,00	11,00	35,70	20,00	82,80	47,00
Promedio	16,08	9,90	43,38	20,50	90,15	49,48
Desviación	2,65	1,16	19,59	10,72	15,60	3,79
3.6	16,10	7,70	62,20	31,20	102,40	47,00
	18,00	13,70	37,90	19,00	104,70	42,00
	16,70	10,70	32,40	16,00	93,90	49,00
	19,00	11,40	34,60	18,70	75,60	42,60
Promedio	17,45	10,88	41,78	21,23	94,15	45,15
Desviación	1,30	2,47	13,80	6,79	13,21	3,40
3.7	27,00	18,40	46,30	22,00	77,00	48,00
	15,00	9,90	32,20	20,20	83,00	50,00
	14,60	10,00	32,00	16,60	85,00	58,40
	13,00	10,60	9,40	20,30	80,00	42,00
	17,40	12,23	29,98	19,78	81,25	49,60
	6,46	4,13	15,26	2,27	3,50	6,78

L= longitud en mm; A=ancho en mm

Tabla S2. Mediciones colorimétricos de clorofila en la línea *PhZTL:iRNA-3* (T1).

Linia 3 (T1)	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7
	26,80	46,80	34,40	47,10	36,30	47,90	36,30
	40,30	39,20	38,20	33,90	24,40	22,80	18,60
	46,60	52,10	21,90	53,10	47,20	33,50	52,00
	35,70	46,20	15,40	19,40	50,00	49,40	49,70
	34,70	45,90	40,30	30,60	33,50	35,00	30,80
	31,70	23,20	33,90	16,90	33,30	38,40	12,40
	31,00	30,10	35,30	45,30	45,60	35,60	37,80
	44,80	23,20	33,70	45,10	47,10	26,80	39,50
	22,70	46,60	22,50	23,00	38,40	53,50	45,90
	40,30	39,30	32,40	12,10	45,00	47,90	40,40
Promedio	35,46	39,26	30,80	32,65	40,08	39,08	36,34
Desviación	7,68	10,37	8,06	14,48	8,20	10,25	12,75

Tabla S3. Mediciones de altura, nº de tallos, tamaño floral, tamaño de hojas y clorofila en la generación T2 de la línea 3 y Mitchell.

Línea 3 (T2)/ Mitchell	Altura (cm)	Nº de tallos	Diámetro corola		Longitud tubo		Longitud hoja base		Ancho hoja base		Longitud hoja central		Ancho hoja central		Longitud hoja base		Ancho hoja base		Longitud hoja central		Ancho hoja central		Clorofila hoja central (valor colorimétrico)			
			P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
3-3-3	48,70	6	5,79	0,36	4,42	0,26	16,50	1,28	6,27	0,84	6,63	1,17	3,14	0,40	2,20	0,58	0,95	0,28	41,87	5,84						
3-3-5	51,00	3	4,43	0,21	4,35	0,18	10,27	1,67	4,43	0,25	4,67	0,67	1,97	0,29	2,37	0,25	1,17	0,21	41,1,7	3,75						
3-3-4	39,50	7	6,31	0,27	4,54	0,17	11,39	0,90	5,73	0,43	5,20	0,18	3,45	0,11	2,07	0,50	1,21	0,21	28,33	4,99						
3-1-2	25,90	9	4,11	0,01	3,61	0,23	12,93	0,57	4,97	0,32	5,33	0,93	1,67	0,28	1,56	0,18	0,64	0,11	43,47	3,39						
3-1-3	23,00	3	5,11	0,21	4,35	0,10	12,82	0,32	5,33	0,35	7,13	0,23	2,60	0,30	3,02	0,15	1,40	0,16	38,65	0,95						
3-1-5	26,55	9	4,50	0,51	3,95	0,35	10,10	1,98	4,50	0,28	4,85	0,64	2,15	0,35	1,90	0,17	1,20	0,71	31,20	7,50						
Mitchell 1	36,50	11	5,36	0,34	4,95	0,25	20,27	0,86	5	0	6,72	1,07	3,53	0,42	3,87	0,55	2,13	0,32	46,93	1,48						
Mitchell 2	34,50	9	5,41	0,31	4,63	0,49	10,90	0,66	6	1	6,30	0,62	3,40	0,52	3,17	0,60	1,63	0,35	38,85	17,36						
Mitchell 3	41,00	6	5,29	0,07	4,49	0,07									3,80	0,35	2,27	0,38	34,00	11,00						
P=Promedio de 4 muestras/planta; D=Desviación estándar																										

Tabla S4. Significancias estadística de comparación fenotípica en la generación T2 (3.1 versus 3.3 y 3.1 versus Mitchell).

3.1 versus	Altura	Nº de tallos	Díámetro corola	Longitud tubo floral	Longitud hoja base	Longitud hoja central	Ancho hoja base	Longitud hoja base	Ancho hoja base	Longitud hoja base	Ancho hoja central	Longitud hoja base	Ancho hoja base	Clorofila hoja central									
3.3	(cm)		(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(valor colorimétrico)									
	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D									
3.1	25,15	2	7,00	3,46	4,57	0,44	4,07	0,37	12,03	1,50	4,91	0,47	5,68	1,28	2,11	0,48	2,14	0,42	1,02	0,46	39,49	6,32	
3.3	46,38	6	5,00	2,00	5,48	0,92	4,44	0,17	13,04	3,60	5,42	0,84	5,65	1,21	2,98	0,79	2,27	0,34	1,18	0,18	34,54	6,53	
Valor p	=0,05899		0,0071***	0,0248*											0,0396*								
3.1 versus	Altura	Nº de tallos	Díámetro corola	Longitud tubo floral	Longitud hoja base	Longitud hoja central	Ancho hoja base	Longitud hoja base	Ancho hoja central	Longitud hoja base	Ancho hoja base	Longitud hoja base	Ancho hoja base	Clorofila hoja central									
Mitchell	(cm)		(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(valor colorimétrico)									
	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D									
3.1	25,15	2	7,00	3,46	4,57	0,44	4,07	0,37	12,03	1,50	4,91	0,47	5,68	1,28	2,11	0,48	2,14	0,42	1,02	0,46	39,49	6,32	
Mitchell	37,33	3	9,00	2,52	5,38	0,29	4,82	0,35	10,53	0,78	5,48	0,78	5,91	1,02	3,25	0,69	3,30	0,82	1,79	0,45	39,30	9,80	
Valor p	=0,07269		0,0001***	0,0006***											0,0145*								
P=Promedio de 8-12 muestras; D=Desviación estándar																							