

FACULTAD DE BIOLOGÍA
GRADO EN BIOQUÍMICA

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular
Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis



TRABAJO FIN DE GRADO

**Papel del fotoperiodo en la floración
y senescencia floral de *Petunia
hybrida***

ALUMNO/A: Elia Beatriz Márquez Cabello

Tutor: Dr. José María
Romero Rodríguez

Directora: Dra. Gloria
Serrano Bueno

Director: Dr. Federico
Valverde Albacete

Sevilla, junio 2022

Índice

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Floración	2
2.2 Control fotoperiódico de la floración.....	3
2.3 Senescencia floral	5
2.4 Senescencia floral y fotoperiodo.....	5
3. OBJETIVOS	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1 Material vegetal, condiciones de cultivo y técnicas de manipulación.....	7
4.1.1 Organismos y condiciones de cultivo.....	7
4.1.2 Análisis del tiempo de floración.....	7
4.1.3 Análisis de la senescencia y abscisión de las flores	7
4.2 Métodos de análisis y manipulación del DNA	8
4.2.1 Plásmidos utilizados.....	8
4.2.2 Clonación de fragmentos de DNA mediante el sistema Gateway	8
4.2.3 Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico.....	9
4.2.4 Inóculo de colonias bacterianas y aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i>	10
4.2.5 Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	10
4.2.6 Restricción del DNA	12
4.2.7 Secuenciación del DNA	12
4.3 Métodos de manipulación y análisis de RNA.....	12
4.3.1 Aislamiento de RNA total y estimación de la concentración.....	12
4.3.2 Reacción de transcriptasa inversa seguida de amplificación de cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR semicuantitativa)	13
4.3.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa y cuantificación por análisis de imagen.....	14
4.4 Preparación y análisis de proteínas	14
4.4.1 Aislamiento de proteína total	14
4.4.2 Cuantificación de proteína total por el método Bradford.....	15
4.4.3 Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	15
4.4.4 Métodos inmunológicos e inmunocitoquímicos	16
4.5 Análisis estadísticos	17

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1 Identificación y caracterización del gen ortólogo de <i>CONSTANS</i> (<i>CO</i>) en <i>P. hybrida</i>	17
5.1.1 Identificación del gen ortólogo de <i>CO</i> en <i>P. hybrida</i> (<i>PhCO</i>) mediante análisis filogenético	17
5.1.2 Análisis del patrón de expresión <i>PhCO</i> (RNA y proteína) en pétalos durante LD.....	18
5.2. Clonaje de <i>PhCO</i> en un vector de expresión de <i>A. thaliana</i>	20
5.3 Comparación del cultivo de <i>P. hybrida</i> en condiciones LD y SD	23
5.3.1 Análisis de la expresión de PhCO en pétalos de <i>P. hybrida</i> cultivada en LD y SD.....	23
5.3.2 Medida del tiempo de floración de <i>P. hybrida</i> LD y SD	25
5.3.3 Medida de la senescencia floral de <i>P. hybrida</i> LD	26
6. CONCLUSIONES	27
7. BIBLIOGRAFÍA	28

1. RESUMEN

El tiempo de floración es un proceso fundamental en el desarrollo de las plantas. En *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), la duración del día (fotoperiodo) presenta un papel crucial en la transición floral, y en concreto, el gen *CONSTANS* (*CO*) tiene una función central estrechamente regulada a nivel transcripcional y postraduccional. El objetivo de este trabajo es aplicar los resultados observados en *A. thaliana* sobre el papel de *CO* en la floración y senescencia floral a la planta modelo ornamental, *Petunia hybrida* (*P. hybrida*). Se llevó a cabo la identificación de un gen ortólogo a *CO* en *P. hybrida*, *PhCO*, y la caracterización del mismo, analizando su expresión génica y niveles proteicos durante 24h. El patrón de expresión de *PhCO* sugiere que éste está sometido a una regulación circadiana similar a la de *CO*. La clonación de *PhCO* en los vectores de expresión pMDC32 y pMDC43 y la posterior transformación de ambas construcciones en *A. thaliana co-10*, nos permitirá realizar un análisis de la floración y senescencia floral y comprobar si *PhCO* es realmente el gen ortólogo de *CO*. La expresión génica y niveles de proteína de *PhCO* también varían en función del fotoperiodo, con una mayor expresión en condiciones de día largo. Además, *P. hybrida* presenta una floración acelerada en condiciones de día largo con respecto a condiciones de día corto. Estos hechos sugieren, como sucede en *A. thaliana*, una inducción fotoperiódica de la floración por *PhCO* en *P. hybrida*.

Palabras clave: *Petunia hybrida*, *PhCO*, *CONSTANS*, fotoperiodo, floración, senescencia floral.

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas necesitan coordinar su fisiología, y por ende su reproducción, con la información del ambiente que las rodea. Los ritmos biológicos permiten a las plantas anticiparse y coordinar eventos biológicos internos con ciertas condiciones exteriores cambiantes como pueden ser la longitud del día (fotoperiodo) y la temperatura (como en el caso de la vernalización). Los ritmos biológicos de mayor trascendencia para las plantas son los que ocurren con periodos cercanos a un día o ritmos circadianos (**Capel et al., 2003; Ng Chee Ping, 2013**). Éstos controlan varios procesos importantes en el desarrollo

de las plantas, incluida la fase de transición del crecimiento vegetativo al reproductivo, conocida como floración (Serrano et al., 2009).

2.1 Floración

La floración tiene un papel fundamental en el ciclo de vida de las plantas angiospermas. Este proceso es también crucial en la industria ornamental porque determina la calidad después de la cosecha, el rendimiento de los cultivos y la adaptación de las plantas ornamentales (Valverde, 2011).

En las plantas superiores, el momento de la transición floral es una decisión muy importante y se controla a través de señales internas y externas que interactúan para determinar el éxito reproductivo (Preston et al., 2014a). Las principales señales internas son la edad y estado de desarrollo y las señales externas o insumos ambientales son la duración del día (fotoperiodo), la calidad de la luz y la temperatura (He et al., 2020). Esta complejidad está mediada por varias vías genéticas que controlan la respuesta a diferentes señales ambientales. Una de estas vías, denominada vía del fotoperiodo, controla la promoción de la floración según la duración del día (Onouchi et al., 2000; Weller & Macknight, 2019; Yanovsky & Kay, 2001).

De hecho, las plantas se han clasificado según su comportamiento de floración fotoperiódica. Se consideran plantas de día largo (*Long day* – LD) a aquellas que florecen preferentemente en días con 16h de luz y 8h de oscuridad, y plantas de día corto (*Short day* – SD), a aquellas en las que la floración se induce en días con 8h de luz y 16h de oscuridad (Golembeski et al., 2014; Valverde, 2011). La planta modelo, *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) florece rápidamente en condiciones de día largo, y por el contrario, se ralentiza durante días cortos (Onouchi et al., 2000). Similar es el caso de la planta modelo ornamental, *Petunia hybrida* (*P. hybrida*), considerada planta de día largo (Preston et al., 2014).

Los genes de *A. thaliana* que afectan el tiempo de floración han sido identificados y colocados en diferentes rutas genéticas. En la vía fotoperiódica destacan el gen *CONSTANS* (*CO*) y el llamado florigeno o *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Simpson et al., 1999; Suárez-López et al., 2001). *CO* promueve directamente la expresión de *FT* para inducir la floración en condiciones de LD. (He et al., 2020).

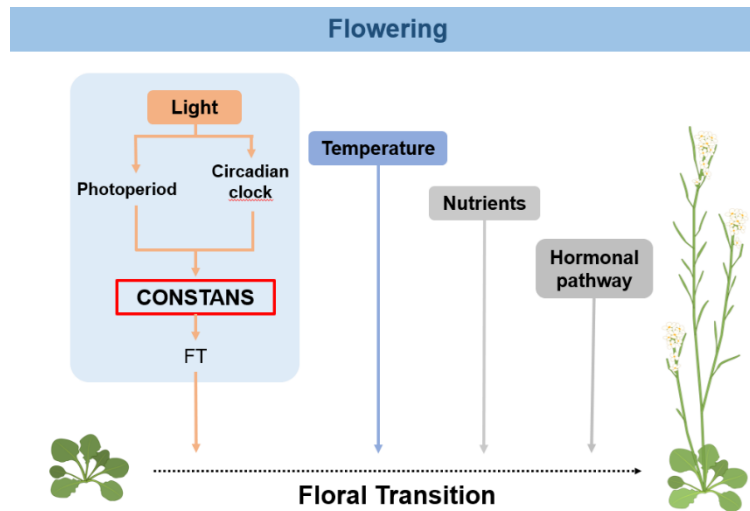


Figura 1. Control de la transición floral. Vías externas e internas de la regulación del proceso de floración. La flecha discontinua representa la transición del crecimiento vegetativo al reproductivo.

2.2 Control fotoperiódico de la floración

Como comentamos en el apartado anterior, en *A. thaliana*, *CO* constituye un gen central en el control de la floración por fotoperiodo (Valverde et al., 2004). La regulación de *CO* es compleja y se produce, tanto a nivel de expresión génica como a nivel de proteína, lo que refleja la importancia que tienen que la planta elija el momento exacto del año en el que se debe liberar la señal del florígeno para un resultado reproductivo correcto (Valverde, 2011). La expresión del mRNA de *CO* está regulada por el ritmo circadiano y el fotoperiodo, mientras que la estabilidad de la proteína está controlada por fotorreceptores, E3 ubiquitin ligasas y por interacción con otras proteínas (Valverde et al., 2004). Esta regulación garantiza que la floración se produzca en condiciones óptimas (Ng Chee Ping, 2013).

En condiciones de LD, la interacción entre la proteína GIGANTEA (GI) y la ubiquitina ligasa FLAVIN KELCH BOX1 (FKF1) produce la activación de la transcripción del mRNA de *CO* al inducir la degradación de los represores transcripcionales conocidos como *CYCLING DOF FACTOR (CDF)*. Por lo tanto, al final de día largo (ZT12, ZT16) se observa un pico de expresión de mRNA de *CO* (Fig. 2A) (Andrés & Coupland, 2012). Además, *CO* también está sujeto a regulación postraduccional, que hace que se establezca al final de un LD cuando la abundancia de mRNA de *CO* alcanza su punto máximo (Valverde et al., 2004). Durante periodos de oscuridad la proteína *CO* es ubiquitinilada por un complejo de ubiquitina ligasa que incluye *CONSTITUTIVE*

PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1) y *SUPRESOR OF PHYTOCHROME A (SPA1)*, lo que permite su degradación por el proteasoma (Fig. 2A).

Por el contrario, en SD no se produce la degradación de los represores transcripcionales de *CO*, y pueden reprimir la transcripción de *CO*. En estas condiciones, el mRNA de *CO* solo alcanza su punto máximo en la oscuridad y la proteína *CO* se degrada a través de la actividad de la ubiquitina ligasa COP1-SPA1, como se describió anteriormente (Fig. 2B) (Andrés & Coupland, 2012), por lo que no se produce la expresión de *FT* y la floración se retrasa.

CO estable y activa desencadena la expresión de *FT*, que se mueve desde el floema hasta el meristemo apical (SAM) y activa el programa de transición floral (Andrés & Coupland, 2012). Este modelo conocido como modelo de la «coincidencia externa» basado en *CO* es el más aceptado para explicar la inducción de la floración por fotoperiodo (Bases Moleculares de La floración, 2011).

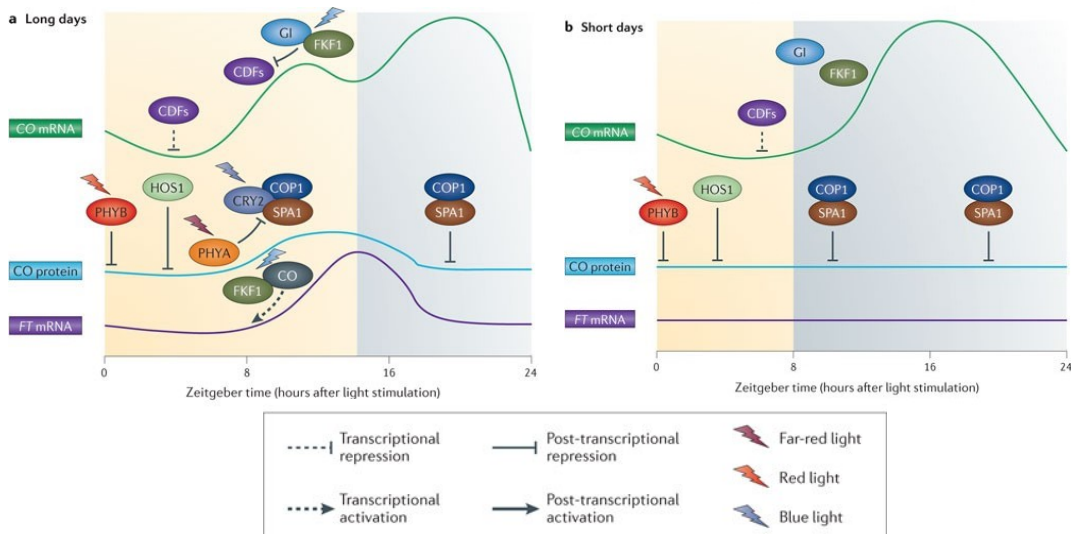


Figura 2. Regulación transcripcional y postraduccional de CONSTANS como control de inicio de la floración en *A. thaliana*. (A) Al final del día largo se produce un pico de expresión de mRNA de *CO* debido a la inhibición de los genes *CDFs* que ejerce el complejo GI-FKF1. Al comienzo del día, PHYB y HOS1 mantienen bajos los niveles de proteína *CO*, mientras que PHYA participa en su estabilización inhibiendo al complejo CRY2-COP1-SPA1, a final del periodo de luz. Dicha estabilización permite la expresión de *FT*, señal que desencadena la floración. (B) Durante el día corto, los *CDFs* inhiben la transcripción de *CO*. El receptor PHYB activo junto con las ubiquitininas ligasas HOS1 y COP1-SPA1 inducen la degradación de *CO*, de manera que no se expresa *FT* y la floración no se produce (Andrés & Coupland, 2012).

2.3 Senescencia floral

La senescencia es un fenómeno natural que implica una disminución gradual de las células y los tejidos funcionales (Serrano-Bueno et al., 2021). Aunque depende esencialmente de la edad, la senescencia ocurre cuando múltiples señales internas y externas se integran en la información relacionada con la edad a través de diferentes vías regulatorias (Majeed et al., 2020; Serrano-Bueno et al., 2021).

La senescencia de la flor es la fase terminal de su desarrollo e incluye la marchitez de las flores, la decoloración de las flores y el desprendimiento de las estructuras florales (Tripathi & Tuteja, 2007). Durante la senescencia floral, tiene lugar una transición del desarrollo que provoca un cambio del anabolismo al catabolismo de biomoléculas, promoviendo la descomposición y removilización controlada de los constituyentes celulares. Además, en la senescencia de la flor se producen cambios como pérdida de organización celular, aumento en la permeabilidad de la membrana, degradación de orgánulos y generación de especies reactivas de oxígeno (Shahri & Tahir, 2011; Tripathi & Tuteja, 2007). Esto viene acompañado de un incremento de unos genes conocidos como *SENESCENCE-ASSOCIATED GENES (SAGs)*, efecto considerado como marca de senescencia. Los *SAGs* están involucrados en varios aspectos de la senescencia, incluyendo el inicio del proceso, inducción de proteasas y nucleasas, modificación de la pared celular e inducción de enzimas oxidativas (Tripathi & Tuteja, 2007).

2.4 Senescencia floral y fotoperiodo

Datos recientes obtenidos en el laboratorio han demostrado una relación directa entre senescencia floral y expresión de *CO* en *A. thaliana*. Como se muestra en la Fig. 3A, la senescencia floral está acelerada en el sobreexpresor de *CO*, 35S:*CO*, mientras que se encuentra retrasada en el caso del mutante *co-10* respecto al WT. Además, estos fenotipos van acompañados de un incremento en la expresión de los genes asociados a senescencia, *SAG13* y *SAG29*, en flores 35S:*CO*, y una disminución significativa en el caso del mutante *co-10* (Serrano-bueno et al., n.d.).

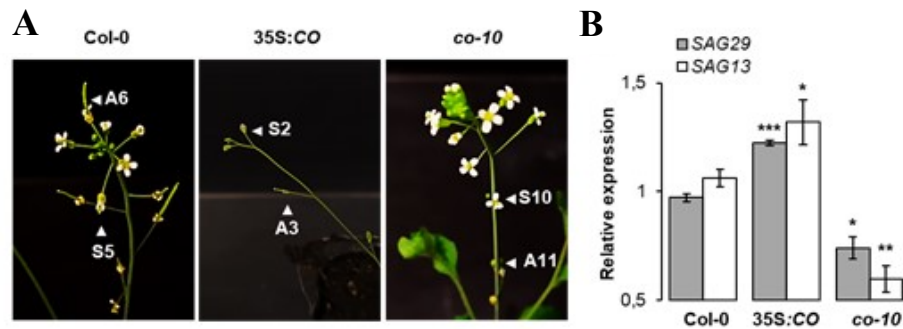


Figura 3. CONSTANS promueve la senescencia y abscisión de la flor. (A) Senescencia floral y abscisión de fenotipos de plantas WT, 35S:CO y *co-10*. La posición y el número de flores para los fenotipos Senescencia (S) y Abscisión (A) están marcados con flechas blancas. (B) Análisis por RT-qPCR de *SAG13* (gris claro) y *SAG29* (gris oscuro) en flores WT, 35S:CO y *co-10*, etapa 14, LD, ZT16. Se utilizó *ACT2* como control. Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de tres experimentos independientes (Serrano-bueno et al., n.d.).

Además de estos datos, existen varios trabajos que sugieren una relación entre senescencia y fotoperiodo. En este sentido, un estudio en 2016 refiere que la expresión del marcador de senescencia *SENESCENCE 4 (SEN4)* en hojas de *A. thaliana* aumenta en plantas cultivadas en condiciones de día largo, sugiriendo una potencial dependencia del fotoperiodo en el proceso de senescencia (Kim et al., 2016).

Otra posible conexión entre CO y senescencia está mediada por los factores de transcripción básico *FLOWERING BHLHs (FBHs)*. En *A. thaliana*, la sobreexpresión de *FBH4* promovió un alto aumento en los niveles de CO y condujo a un fenotipo de floración temprana, mientras que la expresión de CO se redujo en el mutante *fbh1-4* (Ito et al., 2012). En cuanto a la senescencia de *P. hybrida*, (Yin et al., 2015) observaron que en flores, los niveles de *PhFBH4* aumentaban drásticamente durante la senescencia de la flor, lo que indica una posible conexión con la señalización fotoperiódica. Esto sugiere que, si *FBH4* aumenta los niveles de CO, y durante la senescencia aumentan los niveles de *FBH4*, entonces CO también aumenta durante la senescencia.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es aplicar los resultados observados en *A. thaliana* sobre el papel de CO en la floración y senescencia floral a la planta modelo ornamental, *Petunia hybrida*. Para ello se llevan a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación y caracterización del gen ortólogo de *CONSTANS (CO)* en *P. hybrida*.

- 1.1 Identificación del gen ortólogo de *CO* en *P. hybrida* (*PhCO*) mediante análisis filogenético.
- 1.2 Análisis del patrón de expresión de *PhCO* (RNA y proteína) en pétalos durante LD.
2. Clonaje de *PhCO* en un vector de expresión de *A. thaliana*
3. Comparación del cultivo de *P. hybrida* en condiciones LD y SD
 - 3.1 Análisis de la expresión de *PhCO* (RNA y proteína) en flores (pétalos) de *P. hybrida* cultivada en LD y SD.
 - 3.2 Medida del tiempo de floración en plantas de *P. hybrida* cultivadas en LD y SD.
 - 3.3 Medida de la senescencia floral en plantas de *P. hybrida* cultivadas en LD y SD.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal, condiciones de cultivo y técnicas de manipulación

4.1.1 Organismos y condiciones de cultivo

El organismo modelo vegetal utilizados ha sido *Petunia hybrida* var *Mitchell*. Las plantas fueron cultivadas en cámaras de cultivo Analartm, bajo régimen de luz blanca suministrada por tubos LED, a una intensidad de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Algunas se mantuvieron en día largo (16 h luz/ 8 h oscuridad, LD) y otras en día corto (8h luz/ 16 h oscuridad, SD) a 22°C durante el día y 18°C durante la noche. Las semillas fueron previamente incubadas durante 4 días a 4°C en oscuridad. Se denomina *ZEITGEBER TIME 0 (ZT0)* al momento del día en que las luces se encienden.

4.1.2 Análisis del tiempo de floración

Para estimar este parámetro se determinó el tiempo transcurrido entre la siembra de la planta hasta la aparición del botón floral, lo que se conoce como inicio de la floración (**Preston et al., 2014b**). Esto se realizó tanto en plantas en condiciones LD como SD.

4.1.3 Análisis de la senescencia y abscisión de las flores

La senescencia de las plantas se determinó midiendo dos parámetros. Por un lado, se midió la evolución de una misma flor de una planta, es decir, los días que pasaron desde

la aparición de la yema hasta que la flor presentó síntomas senescentes (**Lin & Jones, 2021**). Además, se analizó la senescencia contando la posición de la primera flor senescente de la inflorescencia desde la primera vez que se observa la aparición de pétalos (**Bleecker & Patterson, 1997**).

4.2 Métodos de análisis y manipulación del DNA

4.2.1 Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo, no construidos durante la realización del mismo, se muestran en la siguiente tabla.

Plásmido	Características relevantes	Origen
pDONR207	Vector que permite clonar un producto de PCR que contienen secuencias attB	Invitrogen
pMDC32	Vector de expresión constitutivo que alberga un promotor 35S	(Curtis & Grossniklaus, 2003)
pMDC43	Vector para la fusión traduccional en N-terminal al gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP)	(Curtis & Grossniklaus, 2003)

Tabla 1. Plásmidos utilizados durante el trabajo

4.2.2 Clonación de fragmentos de DNA mediante el sistema Gateway

El sistema de clonación de DNA mediante el sistema Gateway es un método de clonación universal que aprovecha las propiedades de recombinación específicas del sitio del bacteriófago lambda para proporcionar una forma rápida y altamente eficiente de mover secuencias de ADN a múltiples sistemas de vectores. La tecnología Gateway™ consiste en dos reacciones de recombinación seriadas que se representan esquemáticamente a continuación (**Invitrogen, 2011**):

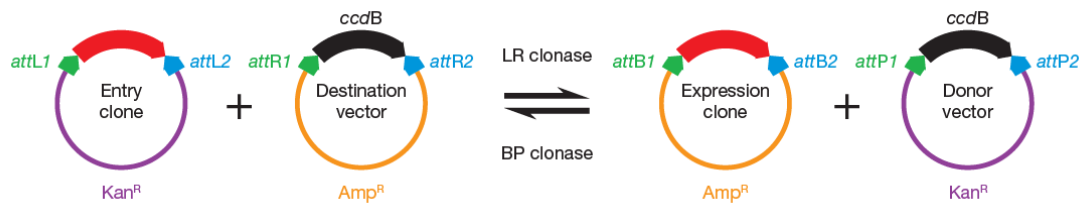


Figura 4. Reacciones de clonación por el sistema Gateway. El esquema muestra los cuatro tipos de plásmidos y enzimas involucradas en la clonación de Gateway. Las flechas rojas representan el fragmento de interés (Invitrogen, n.d.).

Se partió del gen *PhCO* sintetizado con las secuencias attB para utilizar el sistema de clonación Gateway. Se llevó a cabo la primera reacción de recombinación (BP). Para ello se preparó 10 μ l de la siguiente mezcla de reacción: 1 μ l de attB-*PhCO*_pUC57 (≥ 10 ng/ μ l), 1 μ l pDONR207 (150 ng/ μ l), 2 μ l de la enzima BP clonase, y 6 μ l de buffer TE.

Una vez preparada la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h. Por último, se añadió 1 μ l de proteinasa K para terminar la reacción, y se incubó a 37 °C durante 10 min. Con los plásmidos así generados, se llevó a cabo la transformación con células competentes (*Escherichia coli* DH5 α).

La segunda reacción de recombinación (LR) se llevó a cabo de la misma manera utilizando como vector de entrada, pDONR207, como vectores destino pMDC32 y pMDC43 y la enzima *LR clonase*. Con el producto de la reacción de recombinación se transformará la estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* AGV3101 *pmp90*, que se utilizará posteriormente para transformar plantas de *A. thaliana* *co-10*.

4.2.3 Transformación de *E. coli* mediante choque térmico

La transformación de células competentes por choque térmico se realizó añadiendo a la suspensión celular, aún congelada, 1 μ l del DNA de cada reacción BP y LR. Una vez incubado 30 min en hielo, se sometió a choque térmico a 42 °C durante 2 min y se incubó de nuevo en hielo durante 2 min. A continuación, se añadieron 900 μ l de LB líquido estéril y se incubó 1 h a 37 °C en agitación. Finalmente, el DNA se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min, y tras quitar la mayor parte del sobrenadante, se mezcló bien el precipitado con el LB restante, y se sembró en una placa de medio LB con antibiótico. Esta se dejó crecer en una estufa a 37 °C durante toda la noche.

4.2.4 Inóculo de colonias bacterianas y aislamiento de plásmidos de *E. coli*

Para el aislamiento de plásmidos, se tomó, en primer lugar, inóculos de varias colonias bacterianas. Para ello se añadió en tubos de inóculos, 3 mL de medio LB y 3 μ L del antibiótico correspondiente (dilución 1:1000). Para el vector de entrada pDONR207 se usó gentamicina. En el caso de los vectores destino, se usó kanamicina para pMDC32, y estreptomicina para pMDC43. A continuación, cogimos con un palillo esterilizado un inóculo de la placa, agitamos suavemente y dejamos en incubación a 37 °C durante toda la noche.

Para la purificación de plásmidos de *E. coli*, se utilizó un método comercial con el juego de reactivos “ISOLATE II Plasmid Mini Kit” (Bioline) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se añadió 1 mL del inóculo a microtubo y se centrifugó a 11000 rpm durante 30 s. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 250 μ L de tampón P1. A continuación, se añadieron 250 μ L de *lysis buffer* P2, se agitó por inversión y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 300 μ L de *neutralization buffer* P3, se agitó por inversión y se centrifugó a 11000 rpm durante 5 min en microfuga. El sobrenadante se recogió y se pasó a una columna. Se volvió a centrifugar a 11000 rpm durante 1 min, se descartó el filtrado del tubo recolector, y se empezó a lavar la columna donde estaba el DNA. Para ello, se añadieron a la columna 500 μ L de *wash buffer* PW1, se centrifugó 1 min a 11000 rpm y se volvió a centrifugar 1 min más para secar bien la columna. Se repitieron estos pasos añadiendo 500 μ L de *wash buffer* PW2. Por último, se pasó la columna a un microtubo para recoger el DNA, se añadieron 50 μ L de *elution buffer* P, se dejó reposar durante 1 min y se centrifugó 2 min a 11000 rpm.

Una vez realizada la extracción de los plásmidos, se cuantificó el ADN en el espectrofotómetro *nanodrop* utilizando 2 μ L de cada muestra.

4.2.5 Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para comprobar que la clonación por recombinación y el aislamiento de los plásmidos se había ejecutado correctamente, realizamos una amplificación del fragmento de *PhCO*

mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello utilizamos cebadores presentes en cada plásmido (tabla 2).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un aparato T100TM *Thermal Cycler* de Bio-Rad. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL que contenía 5 µL de tampón 5x *MyTaq DNA polymerase* (Bioline), 1 µL de cada cebador a concentración 10 µM, 1 µL de Taq polimerasa, 1 µL de DNA y agua Mili-Q hasta completar los 25 µL. Como control positivo usamos el plásmido vacío, y como control negativo, agua.

Una vez preparada la reacción se programó en el termociclador la temperatura y el tiempo correspondiente a: activación de la polimerasa (95 °C, 2 min), desnaturalización del DNA (95 °C, 30 s), hibridación de cebadores con el DNA (50 °C, 30 s), elongación (72° C, 2 min). Las muestras se sometieron a 30 ciclos sucesivos de estos 3 últimos pasos y, por último, se programó un paso de 72 °C a 10 min para que todas las cadenas que no hubiesen finalizado la elongación terminasen de polimerizar.

Los cebadores utilizados se indican en la siguiente tabla:

Cebador	Secuencia 5'-3'	Homología con	Descripción
FV198	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCT	pDONR207	Forward
FV199	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	pDONR207	Reverse
FV137	CAACAGGATTCAATCTTAAGA	pMDC32/43	Reverse
FV516	CCAGAGCAACAACAATTATGGAA	<i>PhCO</i>	Forward
FV517	CCAAGTAGTCATCCACTAC	<i>PhCO</i>	Reverse
PhCO	GCAACAACAATTATGGAATGTTG	<i>PhCO</i>	Forward
PhCO	GTATATTTTCCATGTCCGTCTTG	<i>PhCO</i>	Reverse
PhACT	TGCACTCCCACATGCTATCCT	<i>PhACT</i>	Forward
PhACT	TCAGCCGAAGTGGTGAAAGAG	<i>PhACT</i>	Reverse

Tabla 2. Relación de oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de amplificación por PCR y por RT-PCR semicuantitativa y en las reacciones de secuenciación

El resultado de las reacciones de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v).

4.2.6 Restricción del DNA

Las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas por la marca comercial Thermo Scientific™. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µL. Las digestiones se realizaron con dos enzimas de restricción simultáneas empleando el tampón adecuado (*FastDigest Green Buffer* [10X]). En la reacción de recombinación BP se utilizaron las enzimas de restricción *PstI* e *HindIII*, y en la LR se usaron *HindIII* y *EcoRI*.

Una vez realizada la mezcla de la digestión, se incubaron las muestras a 37 °C durante toda la noche. Por último, el resultado de la digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v).

4.2.7 Secuenciación del DNA

La secuenciación automática del DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Sanger STAB VIDA (Portugal). En microtubos de 1,5 mL, se añadió el volumen necesario para que la concentración final de cada plásmido fuese de 100 µg/µL y se completó con agua hasta alcanzar los 10 µL. Por último, se añadieron 3 µL cebador correspondiente (tabla 2).

4.3 Métodos de manipulación y análisis de RNA

4.3.1 Aislamiento de RNA total y estimación de la concentración

Para el aislamiento de RNA de *P. hybrida* se utilizó extracción mediante Trizol™ (Invitrogen). El material vegetal se trituró con nitrógeno líquido en un molino de bolas durante 2 min a una frecuencia de 300 s⁻¹ hasta obtener un polvo blanquecino. Al polvo contenido en cada microtubo se le añadió 1 mL de Trizol. Se agitaron todas las muestras en vórtex vigorosamente y se mantuvieron en hielo 5 min. Se añadieron 0,2 mL de cloroformo, se mezclaron los tubos y se dejaron de nuevo 5 min en hielo. A continuación, las muestras se centrifugaron (15000 rpm, 15 min, 4 °C) y el sobrenadante se añadió en tubos nuevos con 0,5 mL de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1) (v/v/v). Se mezclaron los tubos y se dejaron 5 min en hielo. Se volvió a centrifugar (15000 rpm, 10 min, 4 °C) y el RNA presente en la fase acuosa se precipitó con 0,5 mL de isopropanol 100% (v/v). Las muestras se dejaron 15 min en hielo y se centrifugaron (15000 rpm, 10 min, 4 °C). Tras esto se obtuvo un precipitado que se resuspendió en 750 µL de LiCl 3

M, se dejó 10 min en hielo y se volvió a centrifugar en frío (15000 rpm, 10 min). El precipitado se lavó con 500 μ L de EtOH 85% (v/v) y se centrifugó (15000 rpm, 10 min, 4 °C). Por último, se resuspendió el precipitado en 22 μ L de H₂O de alta pureza.

Por último, se cuantificó el RNA en *nanodrop* utilizando 2 μ L de cada muestra.

4.3.2 Reacción de transcriptasa inversa seguida de amplificación de cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR semicuantitativa)

Para las reacciones de RT-PCR semicuantitativa, se obtuvo cDNA a partir de RNA total. Para ello se usó el juego de reactivos “Hiscript III 1 st Strand cDNA Synthesis (+ gDNA wiper)” (Vazyme). En primer lugar, se añadió el volumen correspondiente de cada muestra de RNA (para 500 ng) según las concentraciones obtenidas en el paso anterior y hasta 4 μ L de agua libre de RNasas. A esta mezcla se le añadió 1 μ L de 5x gDNA wiper Mix y se incubó a 42 °C durante 2 min. Posteriormente, se añadió a cada muestra 5 μ L de un stock que contenía la enzima retrotranscriptasa, *buffer 10x RT Mix*, primers oligo (dT)₂₀ VN (tabla 2), *random hexamers* y agua libre de RNasas. Se incubó durante 37 °C durante 15 min según las especificaciones del fabricante y la enzima se inactivó incubando la mezcla a 85 °C durante 2 s. Por último, se diluyó la preparación añadiendo 10 μ L de agua libre de RNasas.

Las reacciones de RT-PCR semicuantitativa permitieron cuantificar la expresión del gen *PhCO* de *P. hybrida*. Utilizamos como gen constitutivo el gen de actina (*PhACT*), que mantenía unos niveles de expresión constante.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un aparato T100TM *Thermal Cycler* de Bio-Rad. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L que contenía 5 μ L de tampón 5x *MyTaq DNA polymerase* (Bioline), 1 μ L de cada cebador a concentración 10 μ M, 1 μ L de Taq polimerasa, 1 μ L de cDNA de la reacción de transcripción reversa anterior, y agua Mili-Q hasta completar los 25 μ L.

Una vez desnaturalizado el DNA (95 °C, 3 min), se sometieron las muestras a 35 ciclos sucesivos con los siguientes pasos: desnaturalización del DNA molde (95 °C, 30 s), hibridación de los cebadores con el DNA (55 °C, 30 s) y elongación (72 °C, 30 s). Por último, se incubó a 72 °C durante 5 min.

4.3.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa y cuantificación por análisis de imagen

El resultado de las reacciones de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1-1,5 % (p/v) en tampón TBE (Tris-ácido bórico 45 mM pH 8, EDTA 2 mM). Como agente intercalante se utilizó SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific) a concentración final de 1 µg/ml en el gel. Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas horizontales y se aplicó una diferencia de potencial entre 100-120 V. Se cargaron las muestras de PCR, además del marcador de peso molecular, en este caso *HyperLadder*TM 50bp. Antes de cargar las muestras, se añadió en la cubeta tampón TBE cubriendo todo el gel. Esto permite que la conductancia eléctrica vaya desde el polo negativo al positivo, y posibilita la separación y detección del fragmento de DNA que habíamos amplificado. La visualización de los geles se llevó a cabo con un transiluminador de luz UV acoplado a una cámara fotográfica.

La cuantificación de la intensidad de bandas en geles de agarosa permitió estimar la cantidad de material genético. Como comentamos anteriormente, se realiza en comparación con el gen actina. El análisis de imagen se realizó con *Image Lab* y los resultados fueron analizados en gráficas hechas mediante *Microsoft Excel*.

4.4 Preparación y análisis de proteínas

4.4.1 Aislamiento de proteína total

Para el aislamiento de proteína total se realizó también la extracción con Trizol con algunas modificaciones con respecto a la extracción de RNA. A lo que quedó en el microtubo original después de añadir el sobrenadante en tubos nuevos para la extracción de RNA, se añadieron 300 µL de EtOH 100 % (v/v). A continuación, las muestras se centrifugaron (2000 g, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante se pasó a un tubo de 2 mL. Se añadió 1 ml de isopropanol 100% (v/v) para que las proteínas precipitaran y se dejó 10 min a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar (12000 g, 10 min, 4 °C), y el precipitado se resuspendió en 1,5 mL de guanidina 0,3 M en 95 % (v/v) EtOH. Las muestras se volvieron a poner en el molino de bolas 2 min a 300 s⁻¹, se pasó el líquido a un tubo nuevo de 2 mL y se centrifugó (8000 g, 5 min, 4 °C). El sobrenadante se tiró y se repitió el mismo lavado dos veces.

Una vez lavado, el precipitado se resuspendió en 1,5 mL de EtOH 90% (v/v) y se colocó en el molino de bolas 2 min a 300 s^{-1} . Se pasó el líquido a un tubo nuevo de 2 mL, y se centrifugó (8000 g, 5 min, 4 °C). Este lavado también se realizó por duplicado (en el último paso de la segunda repetición, la centrifugación fue a velocidad máxima y durante 10 min). El pellet se dejó secar unos minutos debajo del extractor y se resuspendió en 50-100 μL del componente E del tampón EZ (Martínez-García et al., 1999). A continuación, las muestras se sometieron a sonicación a 4 °C en un aparato *Bioruptor*® *Pico sonication device* siguiendo un programa de 10 min que consistió en 10 ciclos 30 s ON, 30 s OFF. Por último, para la correcta resuspensión del precipitado, se colocaron las muestras en un termobloque a 50 °C en agitación durante 10 min. Por último, se realizó la cuantificación de las muestras.

4.4.2 Cuantificación de proteína total por el método Bradford

El método de Bradford se usa para la cuantificación de proteínas y se basa en la unión del colorante, Coomassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante (Fernández & Galván, 2006). Por tanto, el color azul es proporcional al contenido de proteínas y se puede medir en un espectrofotómetro a 595 nm.

Para calcular la concentración de proteínas de las muestras, se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones crecientes conocidas de ovoalbúmina ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Cada una de estas muestras contenía el volumen correspondiente de ovoalbúmina en función de la concentración (desde 0 a 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), hasta 200 μL de agua-MiliQ y 1 mL de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD). Las muestras problema contenían 1 y 2 μL de cada muestra, 199 y 198 μL de agua-MiliQ respectivamente, y 1 mL del reactivo. Una vez calculadas las concentraciones de las muestras con 1 y 2 μL , se hizo la media aritmética de ambas.

4.4.3 Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizaron en geles de acrilamida que contenían dodecil sulfato sódico (SDS). El gel separador se preparó al 12 % (p/v) de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) con

SDS al 10 % (p/v) en tampón Tris HCl 1,5 M (pH 8,8). El gel de empaquetamiento se preparó al 5 % (p/v) de poliacrilamida de la misma composición, con SDS al 10 % (p/v) en tampón Tris HCl 0,5 M (pH 6,8). Los geles se polimerizaron con persulfato amónico (APS) al 10 % (p/v), y como agente catalizador se usó N,N,N,N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED).

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 V. Se usaron aparatos *PowerPac™ Basic Power Supply* (BIO-RAD), utilizando como tampón de electroforesis de proteínas una disolución que contenía Tris HCl 0,25 M, glicina 1,92 M y SDS al 1 % (p/v).

4.4.4 Métodos inmunológicos e inmunocitoquímicos

4.4.4.1 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Para la transferencia del gel de proteínas a la membrana de nitrocelulosa se utilizó un aparato de transferencia *Pierce™ Power Blotter* de la marca Thermo Scientific™. Tras la electroforesis de las muestras de proteína, el gel de poliacrilamida se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro, previamente humedecido con tampón de transferencia (tampón Dumm 10 % [v/v], metanol 20% ([v/v])). Por encima del gel y por debajo de la membrana, se colocaron 3 papeles 3 MM Chr (Whatman) humedecidos en el mismo tampón de transferencia.

Las placas del aparato también se humedecieron en el tampón, y se colocó el “sándwich” en el orden descrito (el gel siempre tiene que ir arriba de la membrana puesto que la corriente va de arriba a abajo). A este se le sometió una corriente máxima de 25 V y 2,5 A durante 45 min. A continuación, la membrana se tiñó unos minutos con una disolución de colorante rojo Ponceau al 0,2 % (p/v) disuelto en una disolución acuosa de TCA al 3 % (p/v). Tras esto, se enjuagó con agua, quedando las proteínas transferidas teñidas de rojo. De esta manera, pudo comprobarse la eficacia de la transferencia utilizando el aparato Amersham™ Imager 680.

4.4.4.2 Inmunodetección por *Western blot*

La membrana con las proteínas fijadas se incubó en tampón TBSt (Tris HCl 1 M [pH 7,5], NaCl 5 M, Tween-20 0,1 % [p/v]), que contenía leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) como bloqueante. La membrana se incubó en este tampón durante 1 h

aproximadamente. A continuación, se añadió el anticuerpo primario en una disolución de leche en polvo en TBSt en una dilución apropiada (1:1000) y se incubó en agitación a 4 °C durante toda la noche. Tras esta primera incubación, la membrana se lavó 3 veces durante 15 min con TBSt y se incubó durante al menos 1 h con una dilución 1:10000 de anticuerpos secundarios (anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo) en la misma disolución de leche en polvo en TBSt. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó de nuevo 3 veces durante 15 min con TBSt. A continuación, se añadió de forma uniforme sobre toda la membrana la solución “Clarity™ Western ECL Substrate” (Bio-Rad), que contenía 500 µL de “Clarity Western Peroxide Reagent” y 500 µL de “Clarity Western Luminol/Enhancer Reagent”. La membrana se cubrió con un plástico y se colocó en oscuridad durante 2-3 min. La peroxidasa catalizó la oxidación del luminol, emitiendo quimioluminiscencia, que fue detectada por el equipo Amersham™ Imager 680.

4.5 Análisis estadísticos

Los datos mostrados son medias de al menos dos experimentos, mostrando la desviación típica en forma de barras de error, excepto en el caso de la Fig. 9B. La significancia estadística entre las medias de diferentes muestras fue calculada usando un test de T de Student de dos colas. Las diferencias estadísticamente significativas se marcan con asteriscos, según sean $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***)).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación y caracterización del gen ortólogo de *CONSTANS* (*CO*) en *P. hybrida*

5.1.1 Identificación del gen ortólogo de *CO* en *P. hybrida* (*PhCO*) mediante análisis filogenético

El primer paso en este trabajo fue identificar el gen ortólogo de *CO* en *Petunia hybrida* var *Mitchell*. Para ello, basado en homología de secuencias (BLAST) se identificaron un total de 5 secuencias homólogas de *CO* en el genoma de *P. hybrida*: *Peaxi162Scf00020g01929.1 CONSTANS-like 2*, *Peaxi162Scf00045g01824.1 Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 4*, *Peaxi162Scf00459g00510.1 Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 4*, *Peaxi162Scf00942g00122.1 Zinc finger protein CONSTANS-LIKE*

5 y *Peaxi162Scf00128g01749.1 Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 14*. Con el fin de identificar el gen ortólogo de *CO* entre las 5 secuencias homólogas, se llevó a cabo un análisis filogenético, incluyendo homólogos de *CO* pertenecientes a otras especies de solanáceas como *Nicotiana benthamiana* o *Solanum lycopersicum*. Para ello, se utilizó la herramienta MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias biológicas mediante la herramienta MUSCLE con el objetivo de comparar las distintas secuencias. Por último, se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético con un método basado en distancia, conocido como UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*). Como se puede observar en la Fig. 5, la secuencia más próxima a *CO* fue *Peaxi162Scf00020g01929.1 CONSTANS-like 2*, apareciendo en el mismo clúster filogenético (cuadro amarillo). De esta manera podemos concluir que *Peaxi162Scf00020g01929.1 CONSTANS-like 2* podría ser el ortólogo de *CO* en *Petunia hybrida* (*PhCO*).

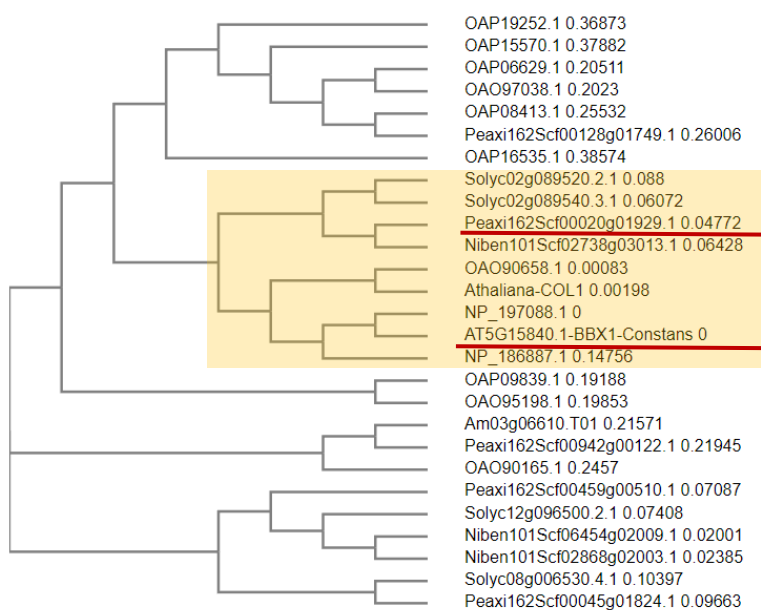


Figura 5. Árbol filogenético de *CO* y sus homólogos. Las secuencias de proteínas proceden de diferentes especies como *Solanum lycopersicum* (SolCyc), *Nicotiana benthamiana* (Niben), *Petunia axillaris* (Peaxi) y *Arabidopsis thaliana*.

5.1.2 Análisis del patrón de expresión *PhCO* (RNA y proteína) en pétalos durante LD

Como comentamos anteriormente, la expresión de *CO* en *A. thaliana* depende del ritmo circadiano, es decir, varía a lo largo del día (Valverde et al., 2004). En este apartado, analizamos el patrón de expresión y los niveles de proteína cada 4h durante LD y para

encontrar si *PhCO* también presenta una expresión distinta durante el día. Este se llevó a cabo en pétalos de *P. hybrida* debido a que es el órgano de interés para posteriormente analizar la senescencia floral.

Para analizar la expresión de *PhCO* se realizaron RT-PCRs semicuantitativas del gen *PhCO*, y del gen constitutivo *PhACT*, usando como cDNA el obtenido en las RTs a partir de extractos totales de pétalos de *P. hybrida* obtenidos cada 4h en LD (Fig. 6A). En el caso del análisis de los niveles de proteína, se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección a partir de los mismos extractos, utilizando un anticuerpo contra CO (Fig. 6B) (Serrano-Bueno et al., 2020).

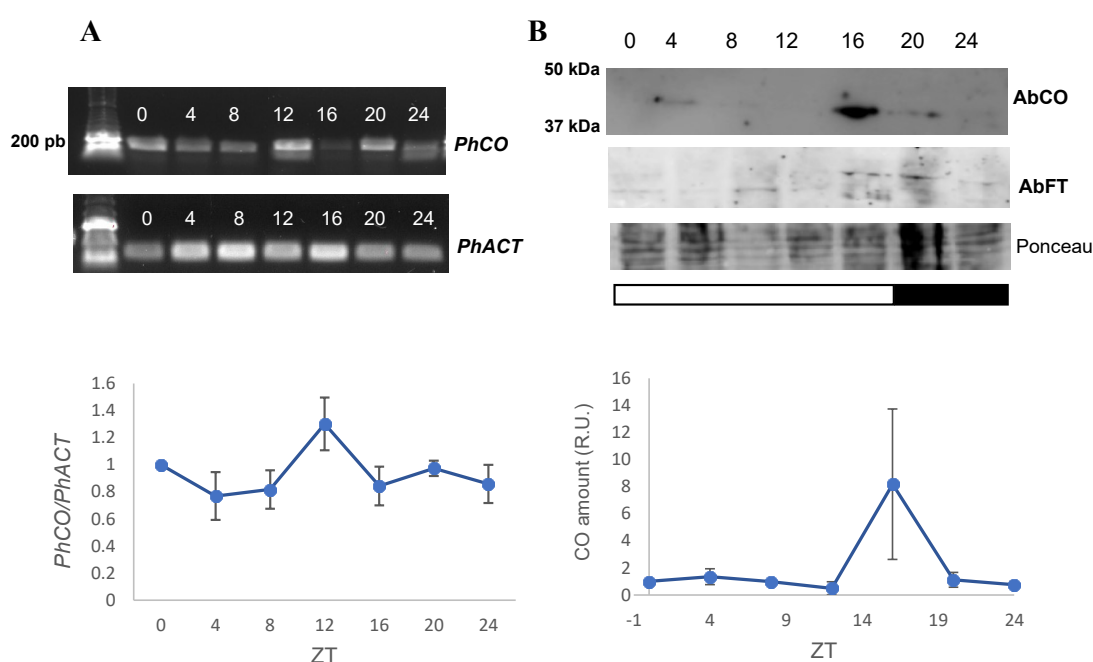


Figura 6. Análisis de la expresión génica y niveles proteicos de PhCO. (A) Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa y cuantificación de los niveles de expresión de *PhCO* y *PhACT* durante 24h. (B) Análisis por *Western blot* de los niveles proteicos de PhCO durante 24h usando anticuerpos contra CO y FT.

Como se muestra en la Fig. 6A, la expresión de *PhCO* varía a lo largo del día observándose en un pico de expresión máxima a ZT12 y un segundo pico menor a ZT20. Este hecho coincide con lo observado en plantas de *A. thaliana* en LD, donde el pico de expresión *CO* también se da al final de la tarde (Andrés & Coupland, 2012). Por tanto, estos resultados sugieren que, en *P. hybrida*, *PhCO* también está sometido a una regulación circadiana similar a la de *CO*.

Respecto al análisis de los niveles de proteína PhCO en LD (Fig. 6B), los resultados mostraron un incremento de PhCO a ZT16, es decir, al final del día. Esto sugiere, que

PhCO podría presentar una regulación a nivel de proteína similar a la previamente descrita para *A. thaliana* (Andrés & Coupland, 2012).

Como comentamos previamente, CO activa la expresión de *FT* en *A. thaliana*. Para comprobar que este hecho también sucedía en *P. hybrida*, se analizó por inmunodetección la producción de la proteína de PhFT a nivel de proteína. Como se muestra en la Fig. 6B, se observó un incremento de la proteína a ZT16. Por lo tanto, este experimento sugiere que, al igual que ocurre en *A. thaliana*, PhCO podría activar a *PhFT* en condiciones de día largo (Samach et al., 2000).

5.2. Clonaje de *PhCO* en un vector de expresión de *A. thaliana*

Para comprobar que realmente *PhCO* es el gen ortólogo de *CO* en *P. hybrida*, y que, al igual que *CO*, tiene un papel importante en la floración y senescencia floral, se llevó a cabo la clonación de *PhCO* en un vector de expresión de *A. thaliana* para complementar ambos fenotipos en el mutante de CO *co-10*. Para ello, *PhCO* se clonó en los vectores de expresión pMDC32 (promotor 35S) y pMDC43 (promotor 35S y fusión N-terminal GFP). Se partió del gen *PhCO* sintetizado con las secuencias attB para utilizar el sistema de clonación Gateway. En primer lugar, se llevó a cabo la reacción BP para clonar *PhCO* en el plásmido pDONR207 (Fig. 7A) y se transformó *E. coli* DH5 α mediante choque térmico. De los clones generados se comprobaron un total de 8, tanto por digestión con enzimas de restricción *HindIII* y *PstI*, como por PCR (tabla 2) (Fig. 7 B-C). Se observó que tras la digestión con las dos enzimas aparecían 2 bandas de diferentes tamaños en todos los casos (Fig. 7B). Una de ellas correspondiente al fragmento *PhCO* (1891 pb), y la otra al plásmido restante (3276 pb). En el caso de la comprobación por PCR, como era de esperar, y a diferencia del control negativo, se observó una banda de 2500 pb en los 8 clones analizados (Fig. 7C). Dado que los 8 clones resultaron positivos, se decidió continuar con el clon #1, cuyo DNA se mandó a secuenciar.

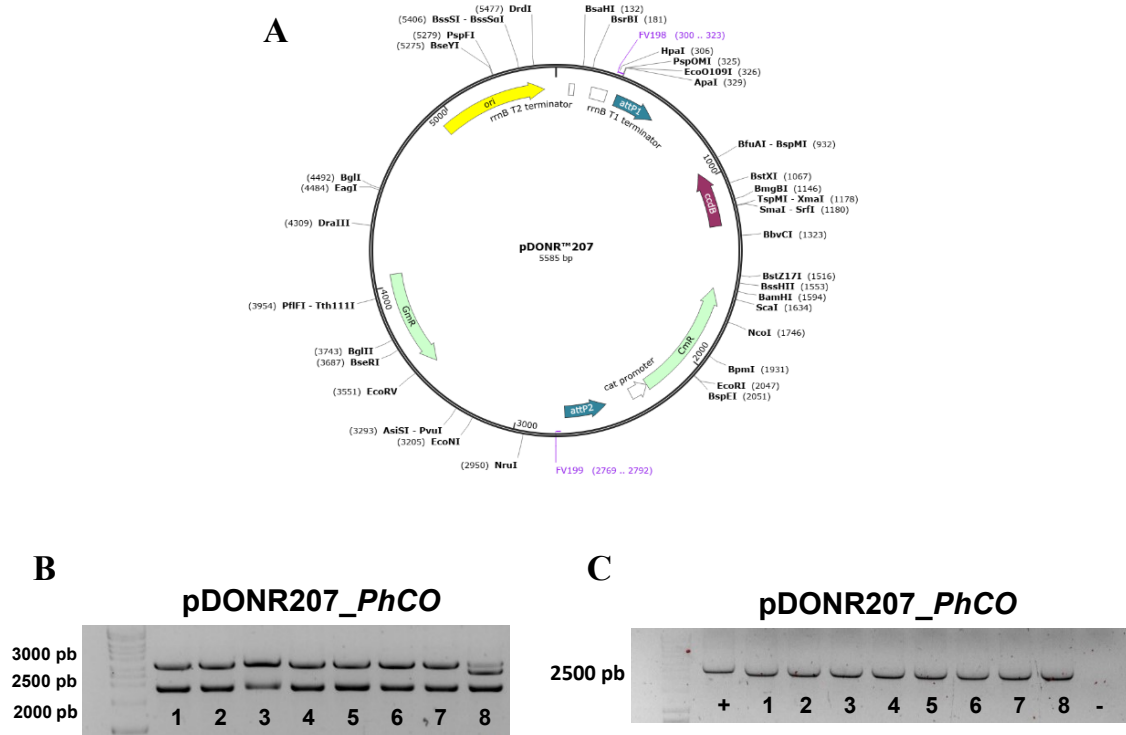


Figura 7. Clonaje de *PhCO* en pDONR207 (A) Mapa del plásmido pDONR207. En morado se representan los cebadores usados y en negro los sitios de corte único de las enzimas de restricción. Imágenes obtenidas de la base de datos SnapGene. (B) Resultados de la digestión tras la reacción BP. Bandas separadas por electroforesis tras la digestión de 8 clones pDONR207_*PhCO* (1-8) con *HindIII* y *PstI*. (C) Análisis por PCR de los 8 clones pDONR207_*PhCO* (1-8). Como control positivo (+) se utilizó el plásmido pDONR207 vacío y como control negativo (-) se utilizó agua como muestra.

Tras la comprobación de la correcta secuenciación, se llevó a cabo la reacción LR para clonar *PhCO* en los dos plásmidos destino pMDC32 y pMDC43 (Fig. 8A) y la transformación de DH5 α . Se comprobaron 4 clones de cada construcción tanto por digestión con enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* por separado, como por PCR (tabla 2) (Fig. 8 B-C). Se observó que tras la digestión tanto con *HindIII* como con *EcoRI* de ambas construcciones aparecieron 2 bandas de diferentes tamaños (Fig. 8B). Tras la digestión de los clones pMDC32_*PhCO* con *HindIII*, las bandas presentaron un tamaño de 2866 pb y 9439 pb, mientras que con *EcoRI*, los tamaños fueron de 2175 pb y 10130 pb. En el caso de los clones pMDC43_*PhCO*, tras la digestión con *HindIII* las bandas tenían un tamaño de 3920 pb y 9095 pb, mientras que con *EcoRI*, las bandas obtenidas presentaron un tamaño de 2175 pb y 10840 pb. Con respecto a la comprobación por PCR, a diferencia del control positivo (pMDC32 y pMDC43), donde uno de los cebadores no estaba presente, y al control negativo, se observó una banda de 1550 pb en pMDC32_*PhCO*#1 y pMDC43_*PhCO*#1 (Fig. 8C). Dado que los clones utilizados de

cada construcción resultaron positivos, se decidió continuar con el clon #1 de cada construcción, los cuales se mandaron a secuenciar.

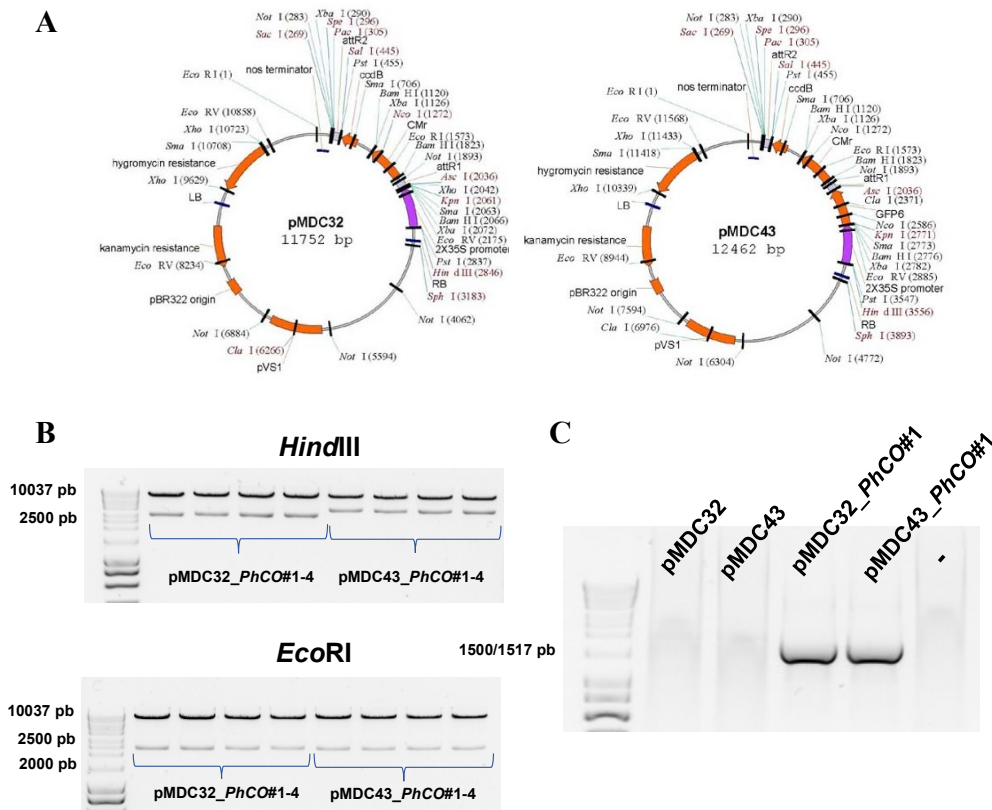


Figura 8. Clonaje de *PhCO* en pMDC32 y pMDC43. (A) Mapa de los plásmidos pMDC32 y pMDC43. (B) Resultados de la digestión tras la reacción LR. Bandas separadas por electroforesis tras la digestión de 4 clones pMDC32_*PhCO* y 4 clones pMDC43_*PhCO* con *HindIII* y *EcoRI*. (C) Análisis por PCR de 1 clon de cada construcción, pMDC32_*PhCO*#1 y pMDC43_*PhCO*#1. Como control positivo (+) se utilizaron los plásmidos pMDC32 y pMDC43 vacíos y como control negativo (-) se utilizó agua como muestra.

Con la clonación de *PhCO* en los vectores de expresión pMDC32 y pMDC43, se han realizado los primeros pasos para determinar si realmente es el gen ortólogo de *CO* en *Petunia hybrida*. Para continuar con este apartado de resultados se transformará con ambas construcciones, por un lado, pMDC32_*PhCO* y pMDC32_*PhCO* en *A. tumefaciens* para posteriormente poder transformar por inmersión floral el mutante de *CO* de *A. thaliana* (*co-10*). Posteriormente, se analizarán tanto el tiempo de floración como la senescencia floral para ambas líneas transgénicas con el fin de revertir ambos fenotipos. Como segunda aproximación, se usarán estas construcciones para transformar *P. hybrida*. Se analizará también la floración y senescencia floral de esta línea transgénica sobreexpresora, en comparación con el fenotipo silvestre. A través de ambas estrategias,

se comprobará que *PhCO* (*Peaxi162Scf00020g01929.1 CONSTANS-like 2*) es realmente el gen ortólogo de *CO*.

5.3 Comparación del cultivo de *P. hybrida* en condiciones LD y SD

5.3.1 Análisis de la expresión de PhCO en pétalos de *P. hybrida* cultivada en LD y SD

En *A. thaliana*, la expresión génica y niveles proteicos de *CO* responden a la duración del día, es decir, al fotoperiodo. En LD, durante las horas de luz *CO* se acumula hasta valores necesarios para activar a *FT* y desencadenar la floración. Sin embargo, en SD, al tener menos horas de luz no se consigue alcanzar dicho valor umbral y, por tanto, no se desencadena la transición floral (Andrés & Coupland, 2012). De esta manera, en *A. thaliana*, se da una regulación fotoperiódica de *CO* (Valverde et al., 2004).

Para comprobar si sucedía lo mismo en *P. hybrida*, comparamos la expresión génica y niveles de proteína de PhCO en pétalos de *P. hybrida* mañana y tarde. Para ello, analizamos la expresión génica de *PhCO* mediante RT-PCRs semicuantitativas y los niveles proteicos de PhCO mediante inmunodetección a dos momentos diferentes del día: en LD a ZT0 (*morning*) y ZT16 (*afternoon*), y en SD a ZT0 (*morning*) y ZT8 (*afternoon*). En condiciones LD, la expresión génica de *PhCO* fue mayor que en condiciones SD (Fig. 9A). Esto se observó tanto a ZT0 como a ZT8/ZT16, siendo la diferencia mayor en ZT0, es decir, por la mañana. A diferencia de LD, donde la expresión génica fue ligeramente mayor por la mañana que por la tarde, en SD no se observaron diferencias entre los dos momentos del día.

Además, como se observa en la Fig. 9B, se detectaron mayores niveles proteicos de PhCO bajo condiciones LD, al igual que lo observado previamente en *A. thaliana* (Valverde et al., 2004). Además, del mismo modo que *A. thaliana*, dentro de día largo, los niveles se van incrementando durante el día desde la mañana (ZT0) a la tarde (ZT16) (Valverde et al., 2004).

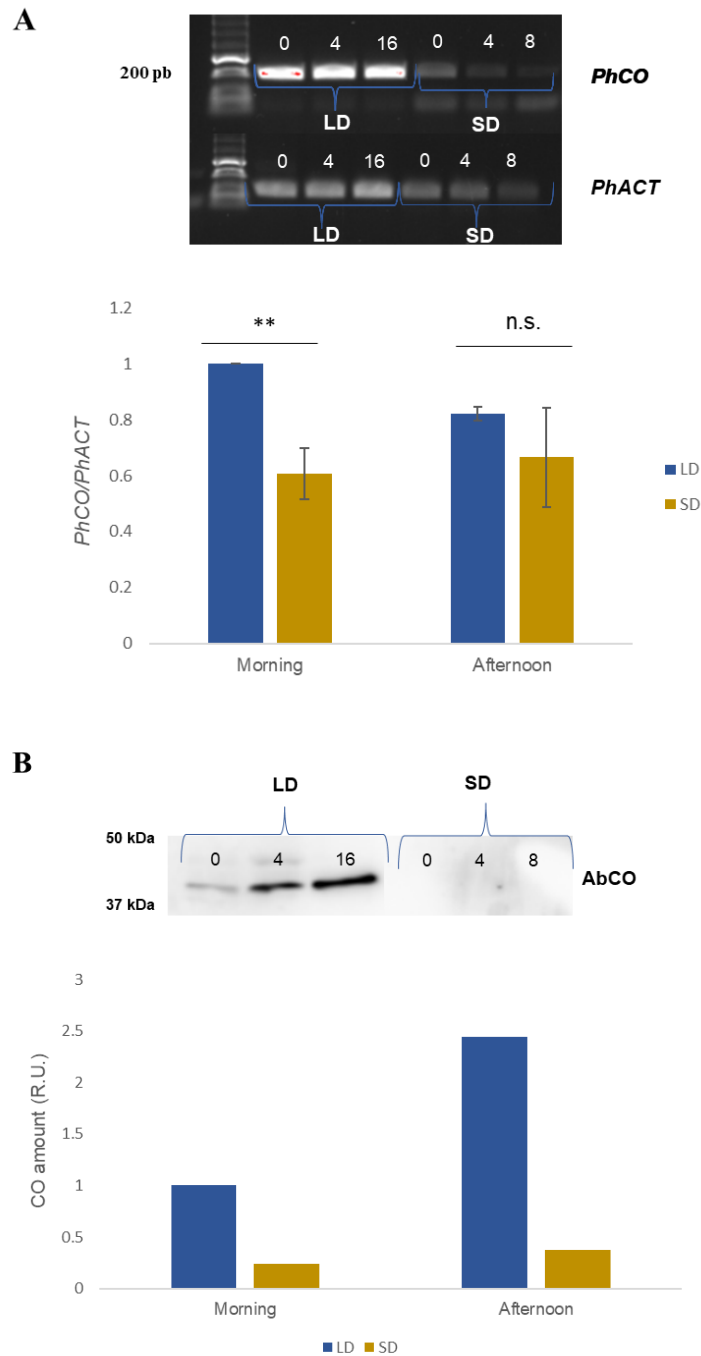


Figura 9. Análisis de la expresión génica y niveles proteicos de PhCO en condiciones LD y SD. (A) Análisis por RT-PCR semicuantitativa y cuantificación de los niveles de expresión de *PhCO* y *PhACT* a ZT0/4/16 en condiciones de LD, y ZT0/4/8 en condiciones de SD. El número de símbolos (*) determina el nivel de significancia (*= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$; ***= $P < 0,001$; n.s. = no significancia). **(B)** Análisis por *Western blot* de los niveles proteicos de PhCO usando anticuerpos contra CO.

Los resultados indican que la expresión génica y niveles de proteína de PhCO varían según las condiciones de luz y oscuridad a las que están sometidas las plantas, es decir, según el fotoperiodo. En concreto, *PhCO* tiende a expresarse bajo condiciones LD, al

igual que la proteína, siendo su expresión menor en condiciones SD. Esto es similar a lo que sucede en *A. thaliana*, por lo tanto, este hecho sugiere la existencia de una regulación fotoperiódica de *PhCO* en *P. hybrida*.

5.3.2 Medida del tiempo de floración de *P. hybrida* LD y SD

P. hybrida es una planta de día largo, sin embargo, aún no se ha analizado su tiempo de floración bajo condiciones de LD y SD. En este apartado, se midió el tiempo de floración de plantas de *P. hybrida* cultivadas bajo estas dos condiciones. Para ello, se contaron los días que transcurrieron desde la siembra de la semilla hasta la aparición del primer botón floral o yema (Fig. 10A). Las plantas cultivadas bajo condiciones LD florecieron de manera considerada mucho antes que aquellas cultivadas en SD (Fig. 10B-C). Concretamente, el tiempo de floración de *P. hybrida* LD fue de $66,06 \pm 3,47$ días, mientras que en *P. hybrida* SD el valor medio fue de $136,06 \pm 12,85$ días.

Esto sugiere que *P. hybrida* es inducida a florecer por fotoperiodos de días largos y que *PhCO*, bajo estas condiciones, podría ser el encargado de acelerar el tiempo de floración de la misma. Esto se ha observado en *A. thaliana*, donde (Putterill et al., 1995), demostraron que en plantas LD con fenotipo mutante *CO* y *GI*, florecían mucho más tarde que las plantas de tipo silvestre, pero florecían al mismo tiempo que las de tipo silvestre en condiciones de día corto. Por tanto, se observó que *CO* era necesario para promover la floración bajo condiciones LD, pero no bajo condiciones SD. Este mismo análisis se podría realizar con nuestra planta modelo, y confirmar así, que *PhCO* acelera la floración en día largo.

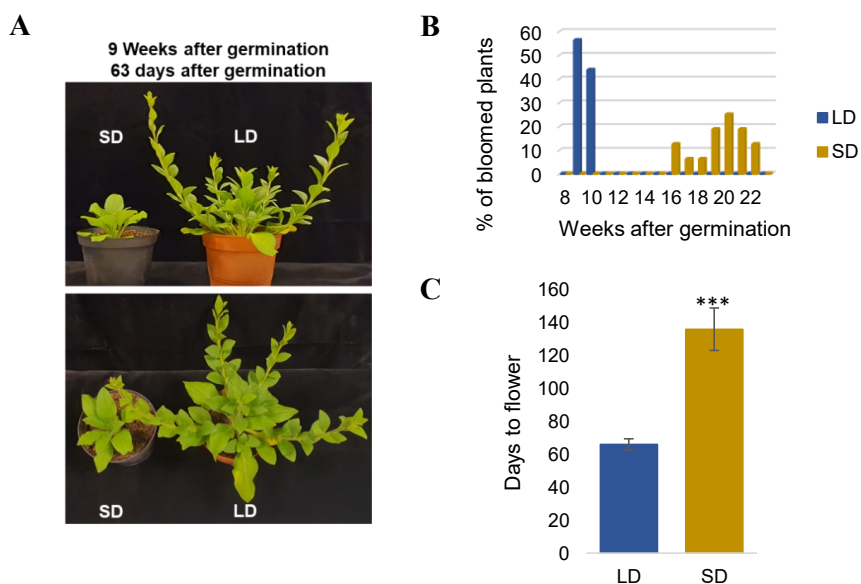


Figura 10. Floración de *P. hybrida* en LD y SD. (A) Ilustración de una planta de *P. hybrida* crecida en día largo (LD) y día corto (SD) 9 semanas después de la germinación. (B) Medida en porcentaje del tiempo de floración (semanas) de plantas de *P. hybrida* LD y SD. (C) Representación de la media junto con la desviación estándar del tiempo de floración (en días) de plantas de *P. hybrida* LD y SD. Se tomó como muestra 16 plantas de cada tipo (N = 32). El número de símbolos (*) determina el nivel de significancia (*=P<0,05; **=P<0,01; ***=P<0,001).

5.3.3 Medida de la senescencia floral de *P. hybrida* LD

Como comentamos anteriormente, se han obtenido datos recientes que demuestran una relación directa entre senescencia floral y expresión de *CO* así como entre senescencia y fotoperiodo en *A. thaliana* (Serrano-Bueno et al., 2021). Para estudiar si existía esta relación en *P. hybrida*, se analizó la senescencia en condiciones de LD atendiendo a dos parámetros. Por un lado, se observó la evolución de una determinada flor de la planta. Para ello, se contaron los días que transcurrieron desde la aparición de la yema hasta que la flor senescía. En la Fig. 11A se ilustra la evolución de una flor de una planta de *P. hybrida*. El tiempo mínimo que tardó una flor en senescer fueron 11 días, siendo el tiempo máximo 24 días. Se estimó que el valor medio de los días que tardaron estas plantas en mostrar síntomas de senescencia floral fue $18,5 \pm 3,71$ (Fig. 11B).

Por otro lado, se analizó la senescencia de estas plantas atendiendo a la posición de la primera flor senescente de la inflorescencia contando desde la primera vez que se observan los primeros pétalos. Se obtuvo una media de $4,05 \pm 1,35$ (Fig. 11C).

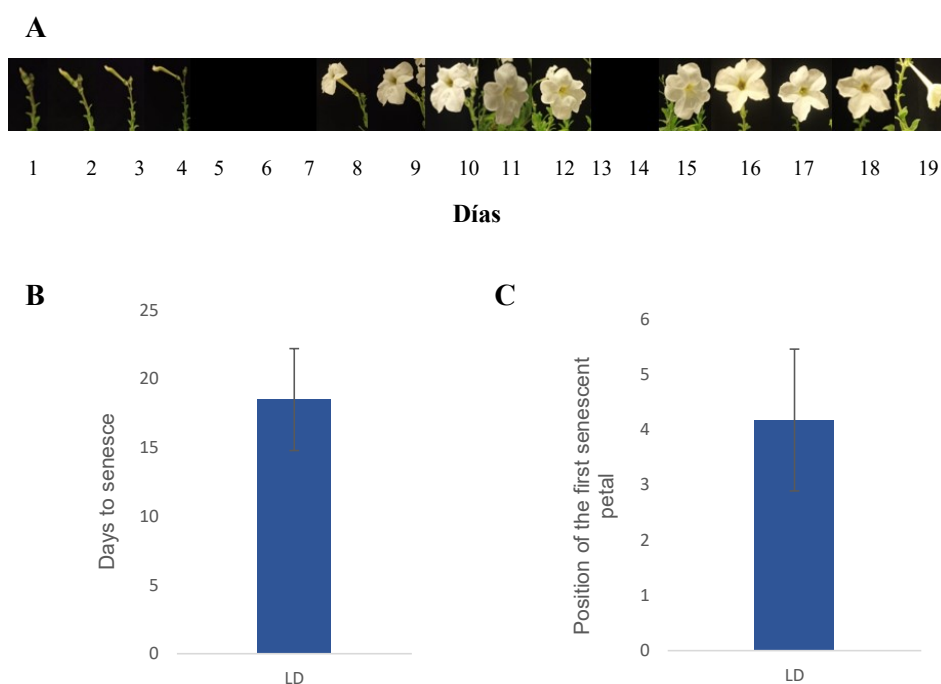


Figura 11. Senescencia floral de *P. hybrida* en LD. (A) Ilustración de una flor de *P. hybrida* desde la aparición de la yema floral hasta la aparición de los primeros síntomas de senescencia cultivada en LD. Se analizaron 12 plantas (N = 12). (B) Representación de la media junto con la desviación estándar de los días que tarda una flor en senescer en plantas de *P. hybrida* LD. Se analizaron 12 plantas (N = 12). (C) Representación de la media junto con la desviación estándar de la de la posición de la primera flor senescente de plantas de *P. hybrida* LD. Se analizaron 18 plantas (N = 18).

Sin embargo, no fue posible medir la senescencia en *P. hybrida* crecida en SD, porque como reflejamos en los resultados del apartado 5.3.2, el tiempo de floración bajo estas condiciones es mayor. Suponiendo que existe una relación directa entre senescencia y *PhCO* (fotoperiodo) en *P. hybrida*, la evolución de la senescencia en plantas cultivadas en SD será más larga y menos progresiva que en plantas cultivadas bajo LD, puesto que la expresión de *PhCO* es menor.

Estos datos sirven como base para después poder compararlos con datos que se obtengan con otras condiciones lumínicas, como plantas cultivadas en SD o bajo diferentes tipos de luz monocromática que afectan a la señal fotoperiódica (roja, azul, etc).

6. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la existencia de un gen homólogo de *CO* en *P. hybrida* (*PhCO- Peaxi162Scf00020g01929.1 CONSTANS-like 2*), cuya expresión génica y niveles proteicos están sometidos a una regulación circadiana similar a la de *CO*.
- La clonación de *PhCO* en los vectores de expresión pMDC32 y pMDC43 permitirá complementar el mutante T-DNA de *A. thaliana co-10* por *PhCO*. Con ello, se analizará tanto el tiempo de floración como la senescencia floral de ambas líneas con el fin de revertir ambos fenotipos. En este caso, se concluirá que *PhCO* es además el gen ortólogo de *CO* en *P. hybrida*.
- La expresión génica y niveles de proteína de *PhCO* también varían en función del fotoperiodo, con una expresión mayor en condiciones de LD. La floración está acelerada en plantas cultivadas en LD, con respecto a plantas cultivadas en SD. Atendiendo a la mayor expresión de *PhCO* en LD, y a que la floración bajo estas condiciones está acelerada, se podría estudiar, como ya se observó en *A. thaliana*, el papel que presenta *PhCO* en la inducción fotoperiódica de la floración en *P. hybrida*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Andrés, F., & Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, *13*(9), 627–639. <https://doi.org/10.1038/nrg3291>
- Bases moleculares de la floración*. (2011). 2–10.
- Bleecker, A. B., & Patterson, S. E. (1997). Last exit: Senescence, abscission, and meristem arrest in arabidopsis. *Plant Cell*, *9*(7), 1169–1179. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1169>
- Capel, J., Lozano, R., Martínez-Zapater, J. M., & Jarillo, J. A. (2003). Ritmos y relojes circadianos de las plantas. *Ecosistemas*, *12*(1).
- Curtis, M. D., & Grossniklaus, U. (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology*, *133*(2), 462–469. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027979>
- Fernández, E., & Galván, A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica*, 1–7. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:M?todos+para+la+cuantificaci?n+de+prote?nas#1>
- Golembeski, G. S., Kinmonth-Schultz, H. A., Song, Y. H., & Imaizumi, T. (2014). Photoperiodic Flowering Regulation in Arabidopsis thaliana. *Advances in Botanical Research*, *72*, 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417162-6.00001-8>
- He, Y., Chen, T., & Zeng, X. (2020). Genetic and Epigenetic Understanding of the Seasonal Timing of Flowering. *Plant Communications*, *1*(1), 100008. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2019.100008>
- Invitrogen. (n.d.). *Gateway cloning technology The trusted leader in cloning technology*.
- Invitrogen. (2011). Gateway LR Clonase II Enzyme mix - Manual. *Life Technologies*, *11791*, 3. <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11791100>
- Ito, S., Song, Y. H., Josephson-Day, A. R., Miller, R. J., Breton, G., Olmstead, R. G., & Imaizumi, T. (2012). FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(9), 3582–3587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118876109>
- Kim, H., Kim, Y., Yeom, M., Lim, J., & Nam, H. G. (2016). Age-associated circadian period changes in Arabidopsis leaves. *Journal of Experimental Botany*, *67*(9), 2665–2673. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw097>

- Lin, Y., & Jones, M. L. (2021). Silencing ATG6 and PI3K accelerates petal senescence and reduces flower number and shoot biomass in petunia. *Plant Science*, 302, 110713. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110713>
- Majeed, N., Panigrahi, K. C. S., Sukla, L. B., John, R., & Panigrahy, M. (2020). Regulatory mechanisms across networks of the circadian clock and senescence pathways. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29(4), 665–674. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00612-6>
- Martínez-García, J. F., Monte, E., & Quail, P. H. (1999). A simple, rapid and quantitative method for preparing Arabidopsis protein extracts for immunoblot analysis. *Plant Journal*, 20(2), 251–257. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00579.x>
- Ng Chee Ping. (2013). 基因的改變 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.007.Arabidopsis>
- Onouchi, H., Igeño, M. I., Périlleux, C., Graves, K., & Coupland, G. (2000). Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *Plant Cell*, 12(6), 885–900. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.6.885>
- Preston, J. C., Jorgensen, S. A., & Jha, S. G. (2014a). Functional characterization of duplicated suppressor of overexpression of constans 1-like genes in Petunia. *PLoS ONE*, 9(5), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096108>
- Preston, J. C., Jorgensen, S. A., & Jha, S. G. (2014b). Functional characterization of duplicated suppressor of overexpression of constans 1-like genes in Petunia. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096108>
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., & Coupland, G. (1995). The CONSTANS gene of arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80(6), 847–857. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90288-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90288-0)
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F., & Coupland, G. (2000). Distinct roles of constans target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science*, 288(5471), 1613–1616. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1613>
- Serrano-bueno, G., Chini, A., Ferreras-garrucho, G., & Reyes, P. D. L. (n.d.). *jasmonate signaling coordinate floral senescence in Arabidopsis*. 1–47.
- Serrano-Bueno, G., Said, F. E., de los Reyes, P., Lucas-Reina, E. I., Ortiz-Marchena, M. I., Romero, J. M., & Valverde, F. (2020). CONSTANS–FKBP12 interaction contributes to modulation of photoperiodic flowering in Arabidopsis. *Plant Journal*, 101(6), 1287–1302.

<https://doi.org/10.1111/tpj.14590>

- Serrano-Bueno, G., Sánchez de Medina Hernández, V., & Valverde, F. (2021). Photoperiodic Signaling and Senescence, an Ancient Solution to a Modern Problem? *Frontiers in Plant Science*, *12*(March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634393>
- Serrano, G., Herrera-Palau, R., Romero, J. M., Serrano, A., Coupland, G., & Valverde, F. (2009). Chlamydomonas CONSTANS and the Evolution of Plant Photoperiodic Signaling. *Current Biology*, *19*(5), 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.044>
- Shahri, W., & Tahir, I. (2011). Flower Senescence-Strategies and Some Associated Events. *Botanical Review*, *77*(2), 152–184. <https://doi.org/10.1007/s12229-011-9063-2>
- Simpson, G. G., Simpson, G. G., Gendall, A. R., & Gendall, A. R. (1999). Hen to. *Transition*.
- Suárez-López, P., K. Wheatley, F. Robson, H. Onouchi, F. Valverde, & G. Coupland. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, *410*(April), 1116–1120.
- Tripathi, S. K., & Tuteja, N. (2007). Integrated signaling in flower senescence: An overview. *Plant Signaling and Behavior*, *2*(6), 437–445. <https://doi.org/10.4161/psb.2.6.4991>
- Valverde, F. (2011). CONSTANS and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering. *Journal of Experimental Botany*, *62*(8), 2453–2463. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq449>
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., & Coupland, G. (2004). Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science*, *303*(5660), 1003–1006. <https://doi.org/10.1126/science.1091761>
- Weller, J. L., & Macknight, R. C. (2019). Genetic control of flowering time in legumes. *The Model Legume Medicago Truncatula*, 182–188. <https://doi.org/10.1002/9781119409144.ch22>
- Yanovsky, M. J., & Kay, S. A. (2001). Signaling networks in the plant circadian system. *Current Opinion in Plant Biology*, *4*(5), 429–435. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00196-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00196-5)
- Yin, J., Chang, X., Kasuga, T., Bui, M., Reid, M. S., & Jiang, C. Z. (2015). A basic helix-loop-helix transcription factor, PhFBH4, regulates flower senescence by modulating ethylene biosynthesis pathway in petunia. *Horticulture Research*, *2*(November), 1–9. <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.59>