

## ESTUDIO DEL RITMO CIRCADIANO EN *PETUNIA X HYBRIDA*

Meryem Tialati, María Vidal y Eva Ros

**IES San Isidoro**

C/ Juan García s/n, 30310 Cartagena (Murcia)

Coord.: (IES) S. Dominguez, A. Aniorte (UPCT) J. Weiss

[4068833@alu.murciaeduca.es](mailto:4068833@alu.murciaeduca.es)

[4068299@alu.murciaeduca.es](mailto:4068299@alu.murciaeduca.es)

[4253295@alu.murciaeduca.es](mailto:4253295@alu.murciaeduca.es)

### RESUMEN

Este proyecto se centró en la rama de la biología, específicamente en la genética vegetal. En este trabajo se analizaron las mutaciones en el gen *Gigantea* de plantas de petunia híbrida. El objetivo era comprender cómo estas alteraciones afectan el ritmo circadiano y el desarrollo de las plantas.

El ritmo circadiano es crucial para regular procesos fisiológicos como la floración y la respuesta al estrés ambiental en las plantas. El gen *Gigantea* juega un papel esencial en este sistema al coordinar y sincronizar las actividades de la planta con el ciclo de luz y oscuridad. Las mutaciones en este gen pueden influir en la expresión de otros genes relacionados, lo que impacta en el crecimiento, la floración y la adaptabilidad de las plantas.

Para introducir mutaciones específicas en el gen *Gigantea*, se utilizó la tecnología CRISPR, aprovechando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como vehículo para la modificación genética. El proyecto tuvo como objetivo identificar mutantes en el gen *Gigantea* y estudiar sus efectos para mejorar la comprensión de su función y explorar su potencial aplicación en la mejora de cultivos.

**Palabras clave:** Petunia híbrida, ritmo circadiano, mutantes, cromatografía de gases y expresión genética.

### SUMMARY

This project focused on the branch of biology, specifically plant genetics. In this work, mutations in the *Gigantea* gene of hybrid petunia plants were analyzed. The goal was to understand how these alterations affect the circadian rhythm and plant development.

The circadian rhythm is crucial to regulate physiological processes such as flowering and response to environmental stress in plants. The *Gigantea* gene plays an essential role in this system by coordinating and synchronizing plant activities with the light and dark cycle. Mutations in this gene can influence the expression of other related genes, impacting plant growth, flowering, and adaptability.

To introduce specific mutations in the *Gigantea* gene, CRISPR technology was used, taking advantage of the bacteria *Agrobacterium tumefaciens* as a vehicle for genetic modification. The project aimed to identify mutants in the *Gigantea* gene and study its effects to improve understanding of its function and explore its potential application in crop improvement.

**Key words:** Hybrid petunia, circadian rhythm, mutants, gas chromatography and gene expression.

## **INTRODUCCIÓN**

La genética vegetal es el estudio de la herencia y variabilidad genética en plantas, incluyendo temas como la reproducción, la estructura genética de las especies vegetales, resistencia a las plagas, sabor, tamaño... y su objetivo es mejorar características específicas. El ritmo circadiano es un sistema biológico interno que se encuentra presente en los organismos vivos. Este sistema se encarga de regular una variedad de procesos fisiológicos incluyendo el ciclo sueño-vigila, la temperatura corporal, el metabolismo y el comportamiento.

En las plantas, el ritmo circadiano es importante en la adaptación a las condiciones ambientales, ya que este brinda una mejor comprensión de los procesos reguladores del crecimiento y la floración. Lo que puede tener varias aplicaciones.

En la agricultura, se pueden desarrollar variedades de plantas más resistentes a las condiciones ambientales extremas, lo que aumentaría la eficiencia y la sostenibilidad de la producción de alimentos.

Así como, para el desarrollo de nuevas técnicas y herramientas biotecnológicas que permitan mejorar la producción agrícola y abordar los cambios ambientales globales.

En este proyecto, se enfocó en la modificación genética de la petunia híbrida, una planta perteneciente a la familia de las solanáceas. Se utilizó la tecnología CRISPR (Repetición Palindrómica Corta Agrupada y Regular) para editar específicamente el gen *Gigantea* de estas plantas. El gen *Gigantea* desempeña un papel crucial en el desarrollo de las flores. El objetivo es introducir una mutación en este gen para estudiar sus efectos y potencialmente mejorar características específicas de la petunia.

Para llevar a cabo esta modificación genética, se empleó la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, la cual lleva un fragmento de

ADN llamado T-DNA en sus plásmidos. Cuando esta bacteria infecta a la planta, inserta el T-DNA en el genoma de la planta, provocando mutaciones.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El principal material utilizado fueron plántulas de *Petunia hybrida* como material vegetal para nuestras pruebas.

Para la extracción de ADN de estas, se empleó un buffer de lisis compuesto por NaCl 1,4M, Tris-Cl pH 8 100mM, EDTA 20 mM, 2% CTAB, 0,2% Mercaptoetanol y RNAasa.

Además, se usó un clorofilómetro para medir la clorofila de las plantas, un calibrador digital (KONGZIR Digital) para medir el ancho y largo de las hojas, y otros instrumentos de medición para determinar la altura de la planta y contar los tallos laterales.

En el proceso de extracción de ADN, se centrifugaron muestras de plantas para obtener una disolución acuosa de cada una, y luego se precipitó el ADN añadiendo alcohol para aislarlo de la solución acuosa. Se utilizaron pipetas para la manipulación precisa de líquidos durante todo el proceso, desde la extracción hasta la preparación de la PCR.

Para la PCR, el material usado fue Taq Polimerasa, cebadores específicos para amplificar el gen *Gigantea2* y el gen control elongation factor 1 $\alpha$ , y agua para la mezcla de PCR. También se usó agarosa para preparar el gel de electroforesis, que luego fue corrida en una cámara de electroforesis con una fuente de alimentación para separar los fragmentos de ADN según su tamaño.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el examen de la clorofila en las hojas medias de las plantas, se observó una mínima variabilidad, con un porcentaje de clorofila que se mantuvo relativamente constante en la mayoría de los casos.

Las hojas apicales, localizadas en la parte superior del tallo de una planta, fueron ampliamente reconocidas como las estructuras que potencialmente albergan los mayores niveles de clorofila. Este supuesto se confirmó en las observaciones, donde las hojas apicales exhibieron consistentemente los niveles más elevados de clorofila, en contraste con las hojas basales, que mostraron las concentraciones más bajas. Este patrón sugirió una distribución diferencial de clorofila a lo largo del tallo de la planta, con implicaciones significativas para su fisiología y su capacidad fotosintética.

En el análisis del ancho foliar realizado mediante un dispositivo de medición, se identificó una notable variabilidad en las dimensiones de las hojas entre distintas posiciones en la planta. Según la expectativa, se anticipó que las hojas basales serían las más anchas, seguidas por las hojas medias y, por último, las hojas apicales. Sin embargo, se observó una excepción destacada.

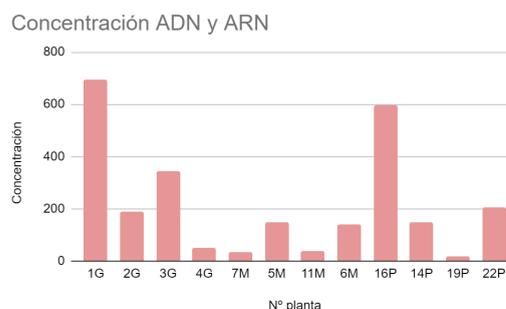
El estudio del largo foliar en nuestras muestras reveló una marcada uniformidad que complementa los hallazgos sobre el ancho foliar. Se observó una correlación significativa entre el largo y el ancho de las hojas, confirmando la esperada relación donde las hojas basales tienden a ser más anchas, mientras que las hojas apicales son las más estrechas, conforme a lo previsto.

En el análisis de la altura de nuestras plantas, se destacó una disparidad significativa entre las plantas ubicadas en los extremos del conjunto, en comparación con aquellas en la región intermedia. Se observó una marcada diferencia, con las plantas iniciales y finales alcanzando alturas considerablemente mayores en comparación con las ubicadas en la parte central del grupo.

Tales variaciones plantearon interrogantes sobre los posibles factores ambientales, genéticos o de interacción entre plantas que

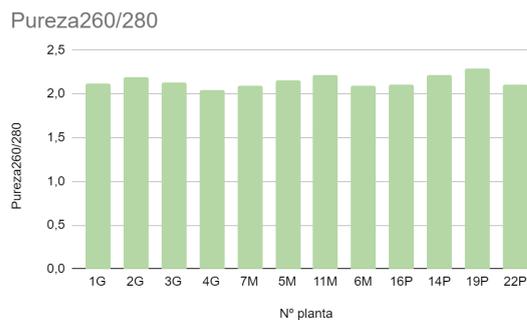
podrían haber estado influyendo en esta divergencia en el crecimiento vertical.

El análisis de concentración y pureza del ADN extraído de las muestras reveló resultados variados, los cuales podían proporcionar información importante sobre la calidad y la integridad del ADN obtenido.

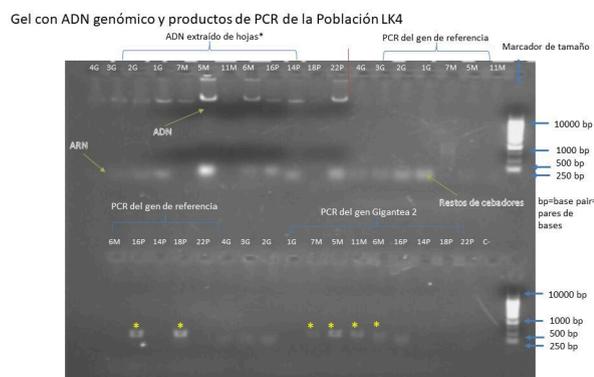


Se observaron concentraciones de ADN que variaron ampliamente entre las muestras analizadas. Hubo una tendencia en las muestras de cada grupo, donde las muestras de los grupos G (Grandes) mostraron concentraciones más altas en promedio en comparación con las muestras de los grupos M (Medias) y P (Pequeñas). Sin embargo, es importante tener en cuenta que hubo excepciones a esta tendencia.

En general, el índice de pureza en las muestras analizadas mostraron valores de ratio 260/280 que estaban en el rango aceptable, aunque hubo algunas variaciones. La mayoría de las muestras presentaron ratios cercanos a 2, lo que sugiere una pureza adecuada del ADN. Sin embargo, algunas muestras, como la muestra 19P, mostraron un ratio ligeramente elevado, indicando la posible presencia de contaminantes orgánicos.



Y sobre la electroforesis, en las muestras marcadas se observaron los amplicones de referencia y del gen Gigantea (asteriscos amarillos) con un tamaño esperado de 320 pares de bases.



\* Amplicones del gen de referencia y de G12 (tamaño esperado: 320 bp)

## CONCLUSIONES

El gen LK4-22P presentó una mutación puntual donde una base de adenina (A) es sustituida por una timina (T) en la posición 27. En cuanto a las plantas 30, 20 y 28, se observó una delección (tipo de cambio genético

que implica la pérdida de un segmento de ADN) de tres bases (CTA) y una sustitución de una base citosina (C) por una guanina (G). Sin embargo, para las plantas 48 y 29, el cambio no se pudo determinar con certeza debido a la presencia de bases indeterminadas (Ns) en la secuencia, lo que impidió la lectura precisa por parte del secuenciador.

Se concluyó por tanto diciendo que los análisis revelaron la presencia del gen, lo que indicó la existencia de una mutación. Y que la PCR demostró que el gen LK4-22P presentaba una mutación, mientras que la secuenciación evidenció la presencia del gen Gigantea.

## AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora del trabajo Sara Gloria Dominguez por el esfuerzo e interés mostrado. A nuestro coordinador del trabajo Alfonso Aniorte por la orientación durante todo el proceso.

Y a nuestra coordinadora de la universidad y a la propia Universidad Politécnica de Cartagena por su colaboración para este proyecto.

## BIBLIOGRAFÍA

Terry López, M. I. (2019). *Analysis of the circadian clock and its role in scent emission in antirrhinum majus and petunia hybrida*.

Recuperado de <http://hdl.handle.net/10317/8833>

[El día 23 de octubre de 2023]

Dakhiya, Y., & M. Green, R. (2019). *Thermal imaging as a noninvasive technique for analyzing circadian rhythms in plants*. Cartagena .

Recuperado de <file:///C:/Users/42538/Downloads/New%20Phytologist%20-%202019%20-%20Dakhiya%20-%20Thermal%20imaging%20as%20a%20noninvasive%20technique%20for%20analyzing%20circadian%20rhythms%20in%20plants.pdf>

[El día 30 de octubre de 2023]