

Silencing of the *GIGANTEA1* gene in *Petunia hybrida* affects the vegetative development

El silenciamiento del gen *GIGANTEA1* en *Petunia hybrida* afecta el desarrollo vegetativo

C. Brándoli^{1*}, M. Egea Cortines¹, C. Petri², J. Weiss¹

¹Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV)–Universidad Politécnica de Cartagena, c. Linterna s/n, 30203, Cartagena. Spain

²Departamento de Fruticultura. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea – CSIC, Avenida Dr. Wienberg, s/n, 29750, Málaga. Spain

*claudio.brandoli@gmail.com

Abstract

Plants have developed a complex organization to cope with environmental changes, synchronizing their physiological processes and metabolism with the rotation of the Earth's axis. This rhythm is regulated by the circadian clock, an intricate system based on a set of genes called the oscillator, forming several feedback loops of transcription and translation. *GIGANTEA* (*GI*), a plant-specific nuclear protein, is a gene belonging to the evening loop of the circadian gene regulatory system. This gene is characterized by its pleiotropic actions, including flowering time, growth and defense against pathogens. Here we show how the specific silencing of the *GI* gene, through the RNA-interference technique, affects the vegetative development in *Petunia*.

Keywords: RNA-interference; circadian clock; vegetative development.

Resumen

Las plantas han desarrollado una organización compleja para hacer frente a los cambios ambientales, sincronizando sus procesos fisiológicos y metabolismo con la rotación del eje de la Tierra. Este ritmo está regulado por el reloj circadiano, un intrincado sistema basado en un conjunto de genes llamado oscilador, que forma varias respuestas cíclicas de transcripción y traducción. *GIGANTEA* (*GI*), una proteína nuclear específica de la planta, es un gen que pertenece al ciclo de la tarde del sistema génico, que regula el ritmo circadiano. Este gen se caracteriza por sus acciones pleiotrópicas, que incluyen el tiempo de floración, el crecimiento y la defensa contra patógenos. Aquí mostramos cómo el silenciamiento específico del gen *GI*, a través de la técnica de interferencia de ARN, afecta el desarrollo vegetativo en *Petunia*.

Palabras clave: ARN de interferencia; reloj circadiano; desarrollo vegetativo.

1. INTRODUCCIÓN

Gracias a la capacidad de reconocer los cambios estacionales, las plantas aumentan sus posibilidades de supervivencia, seleccionando el momento del año más favorable para la floración, y de esta manera aumentando las posibilidades de éxito reproductivo [1].

Hasta ahora, la mayoría de los estudios genéticos moleculares se han realizados usando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* [2][3], demostrando que la floración fotoperiódica y la regulación del reloj circadiano comparten elementos comunes, como los receptores de luz y las proteínas que forman el temporizador circadiano. Gracias a estos estudios sabemos que GI estabiliza ZEITLUPE (ZTL) [4], una proteína F-box conocida por poseer un dominio de detección de luz azul [LUZ, OXÍGENO, VOLTAJE (LOV)] en el extremo N, que facilita su estabilidad. Facilitando la maduración de ZTL en su forma activa, GI, a través de su actividad de proteína chaperona, le permite degradar TIMING OF CAB 1 (TOC1) y PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5 (PRR5) por degradación proteasomal [5] ayudando a mantener una alta amplitud de oscilación de estos genes a lo largo del día. En este trabajo, hemos caracterizado el gen *GI1* en *Petunia x hybrida* y creado plantas transgénicas con pérdida de función, a través del método de ARN de interferencia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Fueron recolectadas semillas de *Petunia x hybrida* (familia Solanáceas), de la variedad doble haploide 'Mitchell'. Las plantas fueron cultivadas en una cámara de crecimiento en condiciones estacionarias de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, una intensidad luminosa de 20-25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2 Diseño y construcción molecular del vector RNAi

A través de una serie de PCR se seleccionó la región de *GI* codificante para *GI1* y se insertaron secuencias attB1 y attB2 para la recombinación a través del método de clonación Gateway® (<https://www.thermofisher.com/>). El amplicón de 225 bp, se recombinó primero en el vector de clonación pDONR201 (Invitrogen) y después en el plásmido binario pHellsgate12 para inducir la formación de estructuras de doble hebra de ARN en forma de horquillas. El gen *nptII*, presente entre los bordes derecho e izquierdo del ADN-T del plasmido binario, fue usado como gen marcador de selección bajo el control del promotor CaMV 35S.

Las construcciones se comprobaron mediante PCR y los productos se evaluaron por análisis en gel de agarosa al 1%. Los cebadores utilizados están enumerados en la tabla 1. Para la transformación en planta se aplicó la cepa desarmada EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

2.3 Generación de las líneas *iRNA::PhGI1*

Para la transformación se utilizó la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. El protocolo de transformación fue desarrollado por el laboratorio de Tom Gerats (Nijmegen) y reúne también la experiencia de Peter de Groot (Nijmegen) y Dave Clark (University of Florida), [6][7]. La transformación genética de las plantas se confirmó mediante PCR y análisis de Southern Blot [8]. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 3 minutos a 95°C , seguidos de 15 segundos a 95°C , 15 segundos a 55°C y 15 segundos a 72°C por 35 ciclos y 5 minutos a 72°C (Kapa Biosystems).

2.4 Muestreo y análisis estadístico

Para el análisis fenotípico, se consideraron diferentes aspectos vegetativos como el tamaño de las hojas, la longitud del entrenudo y el número de meristemos axilares. El análisis estadístico se realizó entre tres y cuatro líneas T1 independientes silenciadas por el gen *PhGI1*, tres plantas de tipo silvestre y tres plantas "siblings" no transgénicas. Los datos sobre las hojas son el promedio de tres hojas por planta.

3. RESULTADOS

Se obtuvieron 3 líneas *iRNA::PhGI1* transgénicas independientes, denominadas 3.7, 4.7 y 8.1. Las hojas basales y apicales de las líneas transgénicas de *PhGI1* se mostraron significativamente más largas y anchas, particularmente en la zona apical, en comparación con las de tipo silvestre y de los “siblings” no transgénicas (Fig. 1; Fig. 2a). Las plantas transgénicas mostraron una mayor dominancia apical, caracterizada por una reducción promedia de la longitud entrenudo y a una porcentual de meristemas axilares a lo largo de la planta, dando como resultado un fenotipo más espeso comparado con las plantas control (“WT” y “siblings”) (Fig. 2b)(Tabla 2). Estas características subrayan un importante cambio estructural en el hábito de crecimiento.

4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que GI1 está involucrado en el desarrollo vegetativo de *Petunia* y que su silenciamiento provoca un cambio en la organización estructural de la planta, caracterizado por un marcado predominio apical.

5. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), especialmente a mi director y a mis codirectores de tesis, la Dr. Julia Weiss, al Dr. Cesar Petri Serrano y al Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines por su disposición y su valioso asesoramiento. También quisiera agradecer la Beca de Especialización Científica y Técnica asociada a actividades de I+D+i de la UPCT (Ref: B-065/16). Esta obra forma parte de los proyectos BFU-2013-45148-R y Seneca 19398/PI/14.

6. REFERENCIAS

- [1] Rubio V., Deng X.W. 2007. Standing on the Shoulders of GIGANTEA. *Plant Sci.* 318(5848):206-207.
- [2] Staiger D., Shin J., Johansson M., Davis S. J. 2013. The circadian clock goes genomic. *Genome Biol.* 14(6), 208.
- [3] Park D. H., Somers D. E., Kim Y. S., Choy Y. H., Lim H. K., Soh M. S., Kim, H. J. 1999. Control of Circadian Rhythms and Photoperiodic Flowering by the Arabidopsis GIGANTEA Gene. *Science.* 285 (5433):1579-1582.
- [4] Kim W., Fujiwara S., Suh S., Kim J., Kim Y., Han L., Somers D. E. 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature.* 449:356–360.
- [5] Cha J. Y., Kim J., Kim T. S., Zeng Q., Wang L., Lee S. Y., Somers D. E. 2017. GIGANTEA is a co-chaperone which facilitates maturation of ZEITLUPE in the Arabidopsis circadian clock. *Nat. Commun.* 8(1), 1–11.
- [6] Gonzalez I. M.. 2012. Identification of novel genes involved in *Petunia* flower development using transcript profiling and reverse genetics. PhD Thesis, DOI:10.31428/10317/3113
- [7] 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.
- [8] Southern E.M.. 1985. E. M. SOUTHERN: Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98(3):503-508.

Tabla 1. Cebadores utilizados

PhGi13utrF	TGGAGAAAGGGCAGAGACAT
PhGi13utrR	GTGGAGCCACCCTTACGTT
PhGi13utrFattb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTGGAGAAAGGGCAGAGACAT
PhGi13utrRattb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTGGAGCCACCCTTACGTT
nptII For	CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG
nptII Rev	CGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG

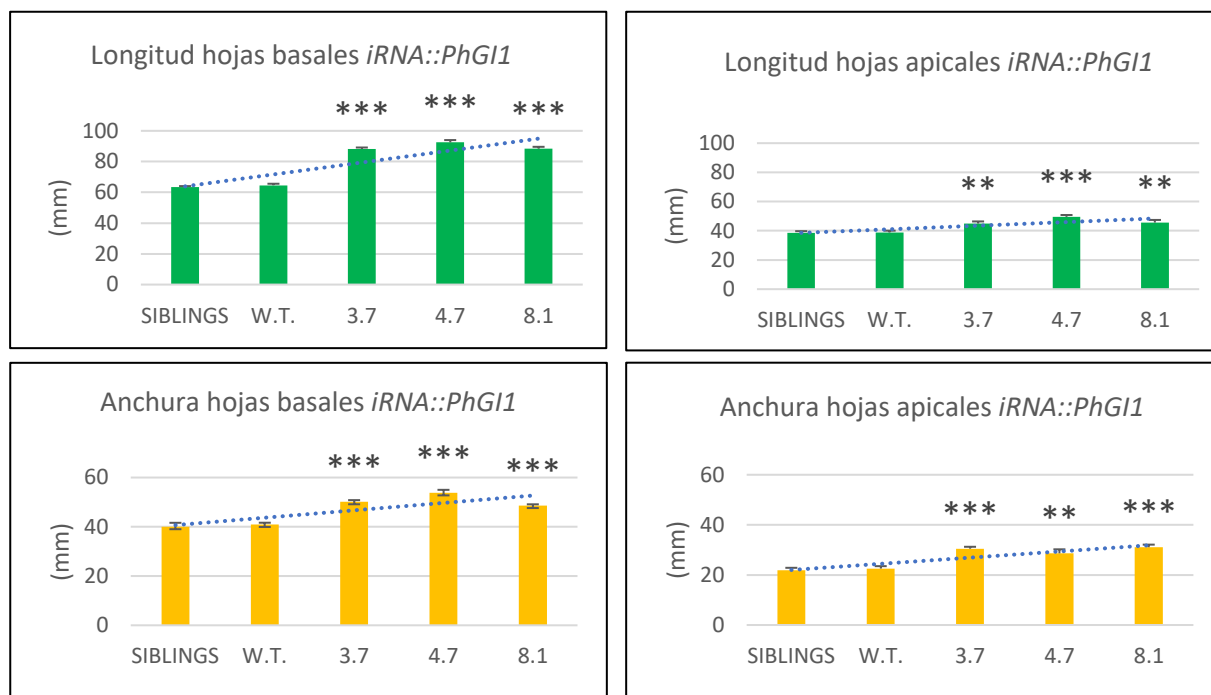


Figura 1. Longitud y anchura de las hojas basales y apicales en tres líneas T1 independientes de *iRNA::PhGI1* en comparación con las plantas hermanas no transgénicas de la línea *PhGI1.1* y el tipo silvestre. Los asteriscos indican significancia estadística, según la prueba T de Student * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.



Tabla 2. Comparación de parámetros vegetativos

Genotype	Wild-Type	<i>iRNA:PhGI1</i>	% GI1 versus W.T.
Entrenudo Basal (mm)	12,61	16,93	+34,4
Entrenudo Mediano (mm)	16,30	10,17	-37,6
Entrenudo Apical (mm)	20,5	13,60	-33,7
Nº de meristemos axilares	34	78	+129,4

Imagen 1. El hábito de crecimiento vegetativo de las líneas transgénicas en comparación con el tipo silvestre. A la izquierda, una línea de tipo silvestre, a la derecha *iRNA::PhGI1* línea 4.8.